

Treball de Fi de Grau

## **Grau en Enginyeria Química**

# **Disseny d'un bioreactor per a l'obtenció de l'àcid cinnàmic, precursor de l'estirè**

### **MEMÒRIA**

**Autor:** Arnau Davesa Turró

**Director:** Jordi Bou

**Convocatòria:** Maig 2019



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Industrial de Barcelona





**Resum**

L'estirè és un hidrocarbur aromàtic derivat del benzè, és precursor de molts productes com cautxú, plàstics, materials aïllants, etc. Actualment la demanda d'estirè es satisfà gracies a la producció d'aquest en refineries, mitjançant derivats del petroli.

El projecte presentat a continuació pretén mostrar que és possible obtenir estirè per vies que no estiguin relacionades amb l'ús de combustibles fòssils o derivats del petroli.

En aquest punt és on prenen importància els conceptes de química sostenible i biorefineria, a partir dels quals es pot desenvolupar-la idea de produir productes comercialitzables o energia de manera més sostenible, utilitzant vies alternatives a matèries primes com el petroli.

L'objectiu doncs, és dissenyar un bioreactor per un planta pilot capaç de produir àcid cinnàmic, precursor de l'estirè.

La reacció que és produeix és la fermentació de glucosa a partir del bacteri E. Coli i s'ha elegit un bioreactor de tanc agitat alimentat per lots, el qual conta amb un sistema d'aeració. Les dimensions del bioreactor són 975x650 mm i amb un volum total de 400L. Aquest dimensionat s'ha realitzat a partir dels objectius de producció.

Finalment es mostra de rendibilitat econòmica i sostenibilitat del treball, essent el cost total del projecte de 15328,5 euros, i un consum elèctric anual de 14400 kWh.



# Sumari

<b>SUMARI</b>	<b>5</b>
<b>1. GLOSARI</b>	<b>9</b>
<b>2. INTRODUCCIÓ</b>	<b>11</b>
2.1 Motivació del projecte .....	12
2.2 Abast del projecte.....	12
<b>3. OBJECTIUS</b>	<b>14</b>
3.1 Objectius generals.....	14
3.2 Objectius particulars.....	14
<b>4. TEORIA 1: LES BIOREFINERIES I LA QUÍMICA SOSTENIBLE</b>	<b>15</b>
4.1 Biorefineries.....	15
4.2 La química sostenible .....	16
<b>5. TEORIA 2: ELS MICROORGANISMES I ELS SEUS PROCESSOS FERMENTATIUS. CINÈTICA DE CREIXEMENT MICROBIÀ. APLICACIONS</b>	<b>18</b>
5.1. Què són els microorganismes .....	18
5.2. Processos fermentatius dels microorganismes.....	21
5.3 Cinètica del creixement microbià.....	24
5.3.1 Corba de creixement.....	24
5.3.2 Cinètica de creixement.....	26
<b>6. TEORIA 3: BIOREACTORS I FERMENTADORS</b>	<b>27</b>
6.1 Aplicacions dels bioreactors .....	28
6.2 Tipus de bioreactors.....	29
6.2.1 Cultius en discontinu (Batch).....	29
6.2.2 Cultius en semi-continú (Fed-Batch).....	30
6.2.3 Cultius en continu (CSTR).....	30
6.3 Factors fisicoquímics que influeixen en el rendiment de les fermentacions....	31
<b>7. TEORIA 4: L'ESTIRÈ I EL SEU PRECURSOR, L'ÀCID CINNÀMIC</b>	<b>33</b>
7.1 l'Estirè .....	33
7.2 Obtenció per síntesi .....	36
7.2.1 L'àcid cinnàmic .....	36
7.3 Obtenció mitjançant vies biològiques .....	37

<b>8</b>	<b>TEORIA 5: ESTAT DE L'ART DE L'OBTENCIÓ DE L'ÀCID CINNÀMIC AMB MICROORGANISMES.</b>	<b>39</b>
8.1	Primer article .....	39
8.2	Segon article.....	39
8.3	Tercer article.....	40
<b>9</b>	<b>MATERIALS I EQUIPS</b>	<b>41</b>
<b>10</b>	<b>RESULTATS</b>	<b>43</b>
10.1	Selecció del fermentador i dades generals .....	43
10.1.1	Temperatura.....	43
10.1.2	pH .....	44
10.1.3	Cultiu, manteniment dels microorganismes i substrat.....	45
10.1.4	Subministrament d'oxigen .....	45
10.2	Paràmetres de disseny.....	45
10.2.1	Càlcul de la capacitat de producció i volum del bioreactor .....	45
10.2.2	Geometria .....	47
10.2.3	Càlcul geometria casquets [32] .....	48
10.2.4	Material.....	49
10.2.5	Sistema d'agitació.....	49
10.2.6	Motor .....	51
10.2.7	Sistema d'aeració .....	52
10.3	Elements addicionals.....	53
10.3.1	Obertures i ports .....	53
10.3.2	Vàlvules.....	54
10.3.3	Fixació casquet superior.....	57
10.3.4	Neteja .....	57
<b>11.</b>	<b>DISSENY DEL BIOREACTOR</b>	<b>58</b>
11.1	Disseny 3D.....	58
11.2	Plànols .....	61
<b>12.</b>	<b>SEGURETAT</b>	<b>63</b>
12.1	Equips de protecció individual.....	63
12.2	Fitxa de seguretat de l'àcid cinnàmic .....	64
<b>13.</b>	<b>ESTUDI ECONÒMIC</b>	<b>66</b>
13.1	Cost del projecte.....	67
<b>14.</b>	<b>ESTUDI D'IMPACTE AMBIENTAL</b>	<b>69</b>
14.1	Càlcul de les emissions del procés .....	69
<b>15.</b>	<b>PLANIFICACIÓ DEL PROJECTE</b>	<b>71</b>

<b>16. CONCLUSIONS</b>	<b>72</b>
<b>17. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>74</b>
Referències bibliogràfiques.....	74





# 1. Glosari

AC: Àcid cinnàmic

*E.coli*: *Escherichia coli*

X: biomassa (cèl·lules)

$\mu$ : velocitat específica de creixement

R<sub>x</sub>: velocitat de creixement de les cèl·lules (g/Lh)

K<sub>s</sub>: Constant de Monod (g/L)

S: concentració del substrat

V<sub>F</sub>: volum final del fermentador (m<sup>3</sup>)

D: diàmetre del bioreactor (m)

N: velocitat d'agitació (rpm)

Re: número de Reynolds

H: altura del bioreactor

Nb: número de deflactors

n: número d'àleps

N<sub>po</sub>: número de potència

P<sub>c</sub>: potència real del motor

m: massa total produïda (1 any)

C<sub>e</sub>: calor específica solució interior del bioreactor.



## 2. Introducció

Actualment la gran majoria de compostos químics que s'utilitzen es produeixen en refineries, és a dir provenen del petroli. El petroli és una matèria prima no renovable molt important des del punt de vista científic i econòmic.

A més els processos de síntesi orgànica o la transformació d'aquest per poder ser utilitzat com a font d'energia són processos contaminants, contribuint a l'augment del diòxid de carboni a l'atmosfera i per tant lligat a totes les problemàtiques que això pugui dur.

Per altre banda el cada cop més ràpid exhauriment d'aquesta matèria està obligant a buscar alternatives viables i amigables amb el medi ambient que ens permetin obtenir subproductes derivats del petroli. Per aquesta via camina la química verda (*Green Chemistry*) i les biorefineries. Aquesta alternativa proposa l'obtenció de productes químics i nous materials de forma poc contaminat i sostenible, com per exemple utilitzant microorganismes.

El principal ús dels microorganismes d'ús industrial és produir una substància d'interès. Les condicions elementals que ha de reunir el microorganisme són que aquest ha de ser genèticament estable, ser capaç de créixer en cultius a gran escala i fer-ho a la major velocitat possible. A més a més, una altra característica indispensable és que no ha de provocar cap tipus de reacció patògena a l'ésser humà o cap altre tipus d'ésser viu.

## 2.1 Motivació del projecte

L'estirè és un compost químic que actualment s'obté industrialment a partir de l'etilbenzè. Es un producte molt important en la indústria química per a la producció de polímers com pot ser el poliestirè.

Se sap però, que és possible l'obtenció de l'estirè a partir de l'àcid cinnàmic. L'àcid cinnàmic és un "*Building block*" molt important per l'elevat nombre de productes del qual és precursor.

La motivació d'aquest projecte dons, és l'obtenció d'àcid cinnàmic, com a precursor de l'estirè. El gran interès d'aquest producte a nivell industrial, obliga a buscar una alternativa sostenible que ens permeti produir estirè.

Per això es proposa dissenyar un bioreactor que permeti obtenir àcid cinnàmic a gran escala mitjançant la fermentació amb microorganismes obtenint així un producte final més sostenible.

## 2.2 Abast del projecte

En aquest projecte es vol dissenyar un bioreactor, que ens permeti obtenir àcid cinnàmic a nivell de planta pilot. A l'hora del disseny del bioreactor s'hauran de tenir en compte les característiques bàsiques de qualsevol bioreactor, així com cada un dels seus paràmetres de disseny.

Un bioreactor és un recipient de volum variable en funció de la quantitat de producte a obtenir. És un sistema que manté un ambient biològicament actiu en el seu interior per facilitar el creixement de cultius cel·lulars, teixits o microorganismes. El procés bioquímic que es duu a terme en el seu interior pot ser tant aeròbic com anaeròbic

Pel que fa al disseny dels bioreactors s'ha de tenir clar els paràmetres fonamentals que en poden fer variar els resultats com serien: la quantitat d'oxigen, nitrogen, diòxid de carboni... o bé la temperatura, el pH, la quantitat d'oxigen dissolt, la velocitat d'agitació, entre d'altres. És per això que la majoria de fabricants industrials de bioreactors utilitzen recipients, sensors, controladors, etc. per poder-ne controlar l'estat a l'interior del recipient.

A part d'aquests paràmetres per poder mantenir l'esterilitat del recipient i evitar la

formació de microorganismes o fongs no desitjats, convé que el recipient sigui fàcil de netejar i que els seus acabats siguin el màxim arrodonits possibles per evitar incrustacions no desitjades a la superfície.

Un altre complement que s'ha d'incloure en el bioreactor és un agitador, el qual permeti mantenir la quantitat d'oxigen dissolt a uns nivells constants. Aquesta tasca és una de les més complicades ja que s'ha de fer un estudi exhaustiu del tipus de pales necessàries per dur a terme l'agitació, així com tenir un control específic de la velocitat d'agitació ja que una velocitat molt elevada augmenta el consum d'energia i pot ocasionar danys en els microorganismes que es troben a l'interior, degut als esforços de tall excessius.

D'altra banda per mantenir el procés a una temperatura constant és necessari que el bioreactor disposi d'un intercanviador de calor amb efecte refrigerador que permeti contrastar l'augment de temperatura produït a l'interior del recipient.

Per acabar, convé tenir present que qualsevol bioreactor o fermentador es classifica en funció del seu mode d'operació el qual pot ser en discontinu, semi continu o bé continu.

## 3. Objectius

### 3.1 Objectius generals.

L'objectiu principal és dissenyar un bioreactor per obtenir àcid cinnàmic a partir del microorganisme *E. Coli*.

El bioreactor es dissenyarà a nivell de planta pilot amb una capacitat de 400 L amb una producció anual de 250 kg d'àcid cinnàmic.

Aquest disseny ve acompanyat d'un estudi econòmic on es mostra la rendibilitat del projecte.

### 3.2 Objectius particulars

- Estudiar la cinètica de creixement i producció de l'àcid cinnàmic descrita a la bibliografia.
- Seleccionar el tipus de fermentador per a una planta pilot.
- Presentar un disseny original del fermentador, que inclogui: el volum, l'agitació, alimentació, materials, control,...
- Proposar un pla d'operacions que inclogui la seguretat del procés.

## 4. Teoria 1: Les biorefineries i la química sostenible

### 4.1 Biorefineries

Les refineries han estat i són uns dels grans motors de la societat actual. Molts productes utilitzats a la vida quotidiana tenen el seu origen en els combustibles fòssils com el petroli, el qual es processa en aquestes instal·lacions anomenades refineries.

A mesura però, que aquest recurs s'esgota, les polítiques mundials lluiten per aconseguir un sistema industrial més sostenible, que utilitzi vies alternatives més sostenibles per a la producció de productes comercialitzables i energia entre d'altres.

D'aquesta necessitat neix el concepte de biorefineria. Com diu el seu nom el concepte és el mateix que el d'una biorefinaria convencional, processar matèria prima per obtenir productes comercialitzables i energia. En aquest cas però, la matèria prima utilitzada es biomassa. Per tant, considerem com a biorefineria qualsevol instal·lació, procés o planta que és capaç de processar la matèria prima provinent de la biomassa per transformar-la en matèria útil [1].

Com ja s'ha dit dons la biomassa es la matèria prima d'una biorefineria com el petroli ho és d'una refineria tradicional. Aquesta biomassa prové de recursos biològics com són els cultius tradicionals, residus orgànics d'origen agrícola, ramader, forestal, industrial o urbà, o fins i tot microalgues.

Per tal de poder aprofitar aquesta ampla gama de biomassa, dins d'una refineria tenen lloc diferents processos i pretractaments que poden ser físics, químics, termoquímics o biotecnològics.

Els principals productes que s'obtenen a les biorefineries inclouen productes energètics, ja sigui en forma de calor o electricitat, diversos biocombustibles, com el biodièsel, el bioetanol o el biogàs. I també altres productes no energètics com pinsos, fertilitzants i bioproductes que substituirien productes de consum provinents de matèries fòssils com bioplastics, biopintures i biolubricants entre altres[1].

En les biorefineries també es poden obtenir productes intermedis que es venen a altres indústries com a "Building blocks" i que posteriorment són transformats en bioproductes.

L'objectiu final de les biorefineries és poder generar productes ja existents en el mercat,

que generalment provenen de matèria prima fòssil i desenvolupar nous productes que incorporin noves funcionalitats.

## 4.2 La química sostenible

La química sostenible, la qual també rep el nom de química verda, és una àrea de la química que està enfocada cap al disseny de productes i processos que redueixin o eliminin els productes nocius, tant per a les persones, el medi ambient o els materials. El terme de Química sostenible se li assigna a Paul Anastas al 1991, però el terme ja havia estat utilitzat al 1987 en un article publicat per l'investigador Trevor Kletz [2].

Es diferencia de la química ambiental, ja que aquesta estudia el comportament de compostos químics, tant naturals com sintètics, en el medi ambient, és a dir, es centra en la eliminació de productes nocius que ja s'han vessat a la naturalesa. Mentre que la química sostenible, té un caràcter preventiu, evitant en la major mesura possible la generació de productes perillosos.

Alguns estudis realitzats durant els darrers anys demostren que el consum de certes substàncies químiques, estaria lligat a l'aparició de malalties com per exemple el càncer. Això ha fet que des de les institucions governamentals es comencessin a prendre mesures més dràstiques de protecció i prevenció per eliminar les emissions i el consum d'aquest tipus de contaminants.

Actualment les seves bases es resumeixen en 12 principis fonamentals, especificats per l'agència de protecció ambiental[3]

1. Prevenció: sempre és millor prevenir des de l'inici la generació de residus tòxics, que eliminar-los un cop s'han creat.
2. Economia atòmica: es basa en el disseny de mètodes sintètics que permeten obtenir la major quantitat de producte final possible, és un mètode selectiu que permet minimitzar la formació de subproductes i de residus.
3. Ús de les tecnologies més segures: sempre s'ha de dissenyar els diferents processos de manera que els productes obtinguts presentin el menor efecte possible sobre la salut humana o el medi ambient.
4. Disseny de productes químics més segurs: que permetin reduir la toxicitat dels diferents productes.

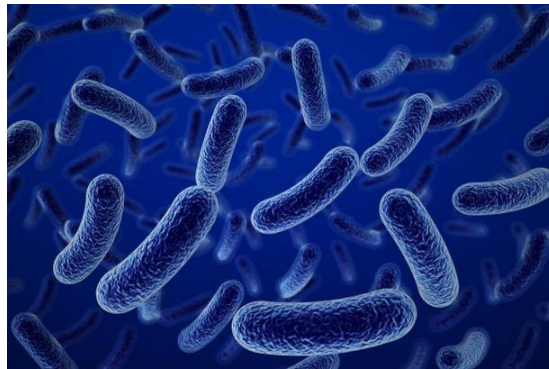


5. Ús de dissolvents i productes auxiliars: s'ha d'evitar tan com sigui possible o almenys reduir-ne la quantitat.
6. Eficiència energètica: s'ha d'intentar treballar a temperatura ambient i a pressió atmosfèrica, per reduir l'impacta ambiental i econòmic.
7. Ús de matèries primeres renovables: s'ha d'evitar l'ús de matèries no renovables les quals amb el temps es van exhaurint, ja que contribueixen en la no viabilitat dels projectes.
8. Reducció de derivats: evitar la formació de derivats els quals requereixen un tractament tradicional.
9. Catàlisi: es preferible utilitzar catalitzadors el més selectius possibles.
10. Degradació controlada: s'ha de dissenyar el procés de manera que al final de la vida útil d'un producte, aquest no resti en el medi ambient.
11. Anàlisi en temps real per a la prevenció de la contaminació: convé monitoritzar i controlar en temps real la formació de substàncies potencialment perilloses.
12. Reducció del potencial d'accidents químics: les substàncies seleccionades en la realització dels diferents processos químics han de permetre minimitzar el risc d'accidents.

## 5. Teoria 2: Els microorganismes i els seus processos fermentatius. Cinètica de creixement microbià. Aplicacions

### 5.1. Què són els microorganismes

Els microorganismes o microbis, són éssers vius, que són estudiats per la ciència denominada microbiologia. No són perceptibles per l'ull humà, es requereix d'equipament especial com són els microscopis per poder observar-los i estudiar-los. A la *figura 1* es mostra un exemple de microorganisme.



*Figura 1: Microorganisme [4]*

Si parlem de la cèl·lula com a unitat bàsica de tot organisme viu, els microbis es poden classificar tant en organismes unicel·lulars com pluricel·lulars, i segons l'estructura de la cèl·lula, tant procariotes, es a dir que no disposen de nucli cel·lular diferenciats, com eucariotes, els quals si disposen de nucli cel·lular. [4]

A nivell industrial, són molt importants per al reciclatge de nutrients en ecosistemes, degut al seu efecte descomponedor, a més presenten un paper important en àmbits com la biotecnologia, ja que intervenen en la preparació d'aliments i begudes.

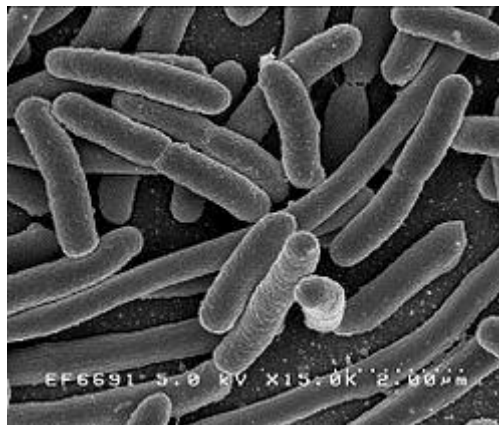
Ara bé, també s'ha de tenir en compte que no tots els microorganismes són bons ja que n'hi ha de patògens, els quals causen la malaltia i fins i tot la mort de nombroses plantes i animals.

Els grups que es presenten a continuació són els tipus de microorganismes amb un cert interès industrial:

- **Bacteris:** són microorganismes procariotes. Són els organismes més abundants en el planeta. Les bactèries són imprescindibles per al reciclatge dels elements i són presents en molts passos dels cicles biològics, com per exemple la fixació del nitrogen atmosfèric. En la indústria són importants en processos de producció d'aliments fermentats com la mantega, formatge, vinagre, iogurt, etc., i en la fabricació de medicaments i altres productes químics importants com l'àcid acètic, l'acetona i l'alcohol etílic [5].

Degut a la capacitat que presenten per a degradar una gran varietat de compostos orgànics, són utilitzats en el reciclatge de residus i són importants en processos com el tractament d'aigües residuals. A més algunes són capaces de degradar hidrocarburs, per tant són útils en l'neteja de vessaments de petroli.

Un altre possible utilitat dels bacteris és que poden ser utilitzats en controls biològics de paràsits, substituint els pesticides. A la *figura 2* es pot observar el bacteri *E. coli*, un dels més utilitzats en la indústria.



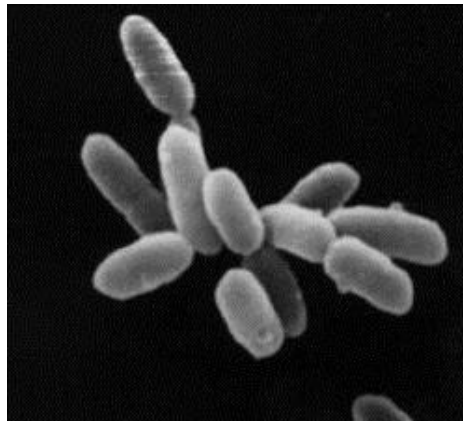
*Figura 2: bacteri E. coli [5]*

- **Arqueas:** Són un grup de microorganismes unicel·lulars amb morfologia procariota. La seva història evolutiva és independent i mostra diferències importants en la seva bioquímica amb les altres formes de vida, per tant representen un domini independent en la biologia [6].

Són importants per exemple perquè es troben a l'intestí dels humans, on són presents en grans quantitats i ajuden a digerir l'aliment.

Els arqueobacteris formen part dels sistemes de la terra que reciclen elements com ara el carboni, el nitrogen i el sofre.

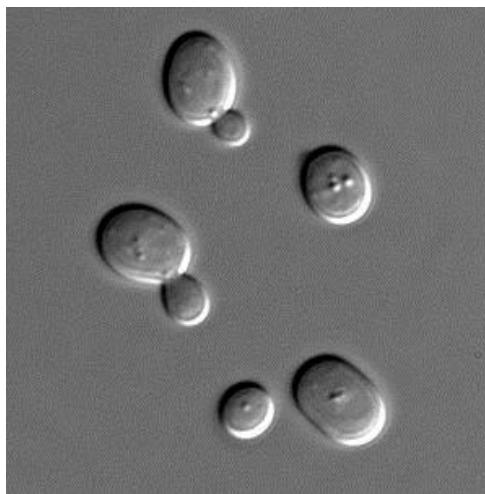
També tenen gran importància en l'àmbit de la tecnologia, on són utilitzats per produir biogàs, i també són utilitzats en processos de depuració. A més hi ha un cert grup d'arqueas anomenades extremòfils, que resisteixen medis extrems com altres temperatures, acideses i alcalinitats extremes, els quals són una font d'enzims. Aquests enzims tenen una gran varietat d'usos com per exemple ADN polimerases termostables. En la indústria, amilases o galactosidases, que suporten temperatures per sobre els 100°C permeten tractar aliments com per exemple en la producció de llet sense lactosa. Aquests enzims també tendeixen a ser estables en dissolvents orgànics, permetent-ne la utilització en processos respectuosos amb el medi ambient en l'anomenada química verda.



*Figura 3: Aloverquea [6]*

- **Fongs:** Són un grup de microorganismes eucariotes. La majoria d'espècies creixen en forma de filaments multicel·lulars, anomenades hifes, i que coneixem comunament com floridures. Els llevats en canvi, són un altre tipus de fong, i són organismes unicel·lulars.

Aquests últims de fet tenen un paper molt important en la indústria. Els llevats són usats en la producció de cervesa, vi i pa entre altres, com el que s'observa en la *figura 4*. També es pot destacar la producció d'etanol o insulina, que també prové de fermentació amb llevats. [7]



*Figura 4: fong Saccharomyces cerevisiae*[7]

## 5.2. Processos fermentatius dels microorganismes

La fermentació s'entén com el procés metabòlic que allibera energia, en el qual els organismes que intervenen converteixen nutrients com el midó o hidrats de carboni en alcohols o àcids. Un bon exemple és el del cas del llevat, el qual realitza la fermentació per a l'obtenció d'energia mitjançant la conversió de sucre en alcohol.

La fermentació dons es l'activitat microbiana que es duu a terme en un medi determinat, i aquest fenomen està molt lligat amb el creixement cel·lular.

Un dels factors més importats per a que hi hagi creixement cel·lular, és tenir un ambient controlat i favorable per als microorganismes. Les principals condicions ambientals a tenir

en compte són[9]:

- Medi aquós. Totes les reaccions biològiques es realitzen en presència d'aigua. L'aigua és en general el principal component del medi de cultiu.
- Temperatura de creixement. El rang de temperatures que afavoreix el desenvolupament microbià es molt concret per a cada tipus de microorganismes.
- Acidesa. En general els bacteris creixen en medis neutres (pH 7.0), amb alguna excepció com les bactèries làctiques que creixen en pH àcids. Per altre banda, la majoria de fongs filamentosos i llevats, tenen afinitat per medis àcids, al voltant de pH 5.
- Pressió parcial d'oxigen. Distingim 2 tipus de microorganismes en funció de la necessitat o no d'oxigen. Els microorganismes aeròbics, els quals necessiten oxigen per poder dur a terme el desenvolupament microbià, i els microorganismes anaeròbics, per als quals l'oxigen es tòxic.

Un altre factor molt important a tenir en compte per al creixement microbià és el substrat. Els microorganismes requereixen d'una font de carboni per poder realitzar la fermentació. Els substrats més comuns són els hidrats de carboni com el midó i sucres [10].

Com ja s'ha exposat abans, hi certs tipus de microorganismes amb un cert interès industrial com son els fongs, les arqueas o els bacteris. En els esquemes 1,2 i 3 es pot observar les línies de producció més importants d'alguns d'aquests.

A les *figures 5, 6 i 7* es mostres processos de fermentació de llevats, bacteris i fongs filamentosos respectivament.

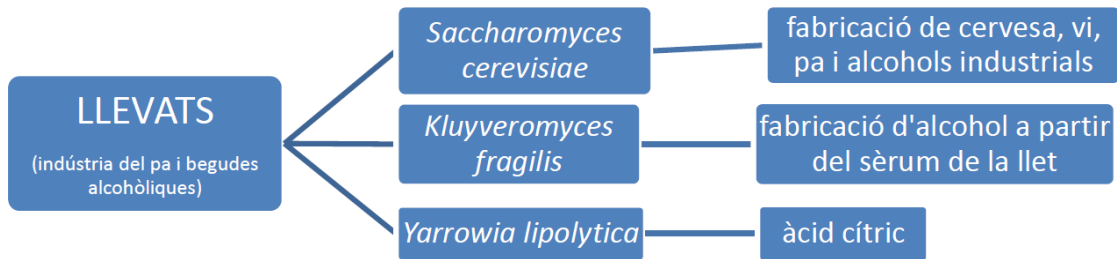


Figura 7: processos de fermentació a partir de llevats [8]

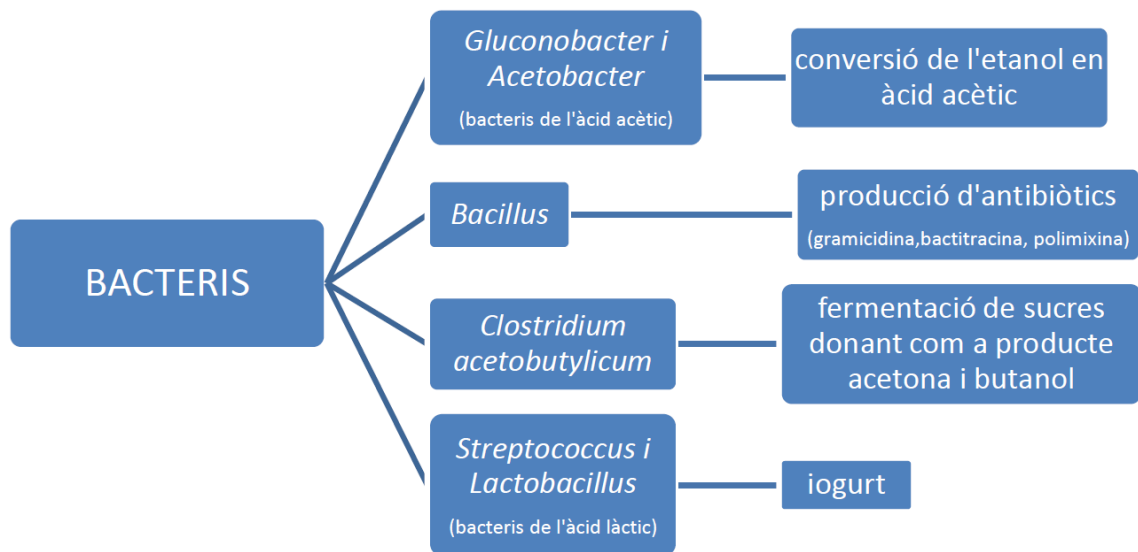


Figura 6: processos de producció a partir de bacteris [8]

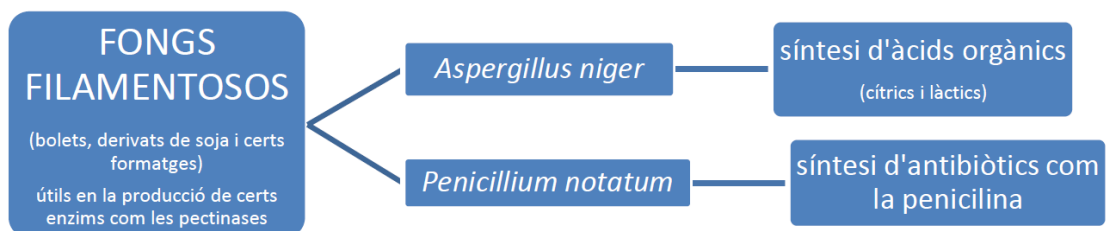


Figura 5: processos de fermentació a partir de fongs filamentosos [8]

## 5.3 Cinètica del creixement microbià

El creixement microbià fa referència a l'augment del nombre de microorganismes al llarg del temps, per aquest motiu en microbiologia, el creixement s'estudia per poblacions. En general, els microbis es reproduïxen per bipartició, que consisteix en la divisió d'una cèl·lula en dues isomorfes.

Quan es tenen microorganismes en un medi de cultiu apropiat, els mateixos comencen a dividir-se activament, utilitzant els nutrients que aporta el medi de cultiu. Aquest procés continua fins que el algun nutrient del medi de cultiu s'esgota, el que s'anomena substrat limitant. També es pot aturar el creixement per l'acumulació d'alguna substància inhibidora formada pels propis microorganismes. Tenim doncs dos aspectes clarament diferenciables pel que fa al desenvolupament microbià, un estequiomètric pel qual la concentració final de microorganismes dependrà de la concentració i composició del medi de cultiu, i un de cinètic que ens dirà amb quina velocitat es duu a terme aquest procés.

### 5.3.1 Corba de creixement

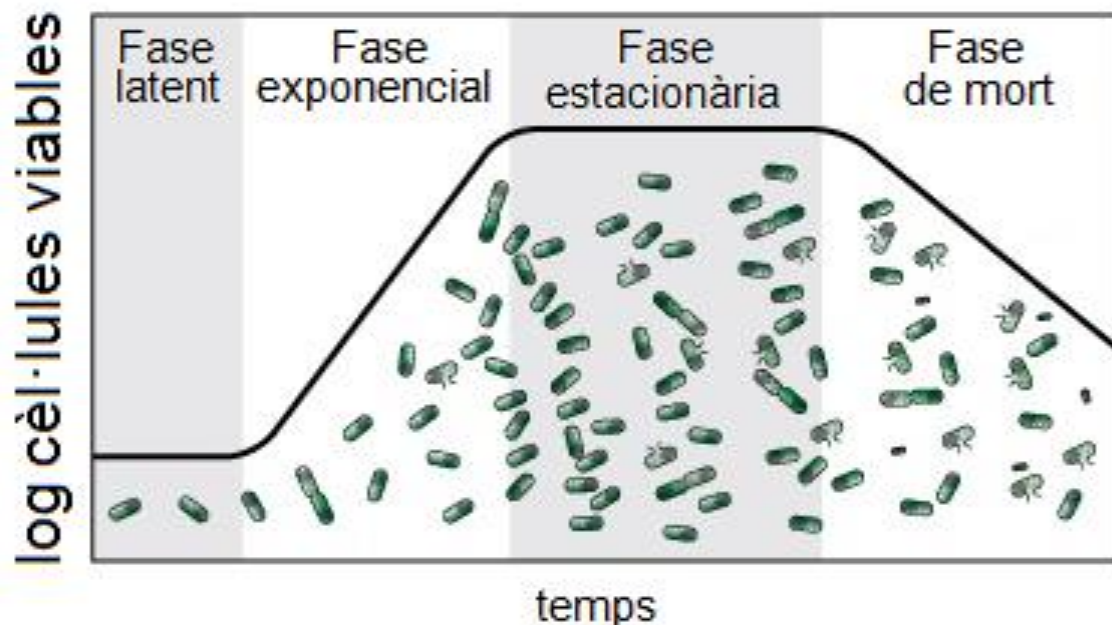


Figura 8: fases de creixement microbià[11]



La corba de creixement d'un cultiu microbià pot se subdividida en quatre parts diferents tal i com es pot observar en la *Figura 8*.

A continuació es descriuen les diferents fases que es poden diferenciar en el creixement cel·lular [11]:

- **Fase de latència:** és el període d'ajust que les cèl·lules experimentes al ser transferides d'un medi a un altre abans d'iniciar el creixement. En aquesta fase es produeixen els enzims necessaris per a poder efectuar el desenvolupament microbià. En aquesta fase, tot i que no hi ha un increment del nombre de cèl·lules, sí que hi ha una elevada activitat metabòlica.
- **Fase exponencial:** És la fase durant la qual els microorganismes creixen i es divideixen. El nombre de noves cèl·lules que apareixen per unitat de temps és proporcional a la població actual. Si no es limita el creixement, la duplicació continuarà a ritme constant i per tant, el nombre de cèl·lules es duplica en cada període de temps. Per a aquest tipus de creixement exponencial, la representació gràfica del logaritme del nombre de cèl·lules en front el temps genera una línia recta.
- **Fase estacionària:** Durant aquesta fase, el creixement dels microorganismes s'interromp a causa de l'esgotament dels nutrients i per l'acumulació de productes tòxics. La taxa de creixement de les bactèries s'igual a la taxa de mort, fet que suposa que el nombre total de microorganismes es mantingui constant.
- **Fase de mort:** La principal conseqüència de la mort de la cèl·lula, és l'esgotament de les reserves cel·lulars d'energia. Igual que la fase de creixement, també es representa com a una disminució lineal del número de cèl·lules.

### 5.3.2 Cinètica de creixement

Per determinar la cinètica de creixement, una de les equacions més utilitzades és l'Equació de Monod[12]:

La velocitat d'acumulació de biomassa és:

$$\frac{dy}{dt} = \mu x \quad (1)$$

On  $x$ =biomassa (cèl·lules)

$\mu$ = velocitat específica de creixement

Monod va relacionar la velocitat específica de creixement amb la velocitat màxima de creixement de la següent manera:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \quad (2)$$

on:  $\mu_m$ = velocitat específica màxima de creixement

$K_s$ = Constant de Monod

$S$  = concentració del substrat

I per tant, si combinem les 2 equacions obtindríem:

$$\frac{dy}{dt} = \mu_m \frac{Sx}{K_s + S} \quad (3)$$

## 6. Teoria 3: Bioreactors i fermentadors

Un bioreactor és un sistema o volum de control que manté un ambient biològicament actiu que permet obtenir el producte desitjat. En molts casos, en els bioreactors es duen a terme processos químics que involucren organismes. Aquest procés pot ser aeròbic o anaeròbic[13]. A la *figura 9* s'observa l'esquema bàsic d'un bioreactor.

Els bioreactors són comunament cilíndrics, variant el volum des de mil·lilitres fins a metres cúbics i en fabriquen d'acer inoxidable.

Un bioreactor doncs busca mantenir certes condicions ambientals tenint en compte les necessitats dels diversos microorganismes, cèl·lules o enzims que s'han d'especificar a l'hora de realitzar el disseny.

S'ha de tenir en compte alguns paràmetres que poden influenciar en la reacció i fer que el producte resultant no sigui el desitjat:

- S'ha de controlar les concentracions inicials dels productes que es vol fer s quals han de ser baixes per evitar que els substrats reaccionin amb els productes i inhibeixin el procés.
- Els microorganismes poden contaminar les mostres, és per això que els processos s'han de realitzar en àrees controlades.
- Algunes substàncies poden patir mutacions durant la reacció originant productes no desitjats.

### Esquema de un bioreactor

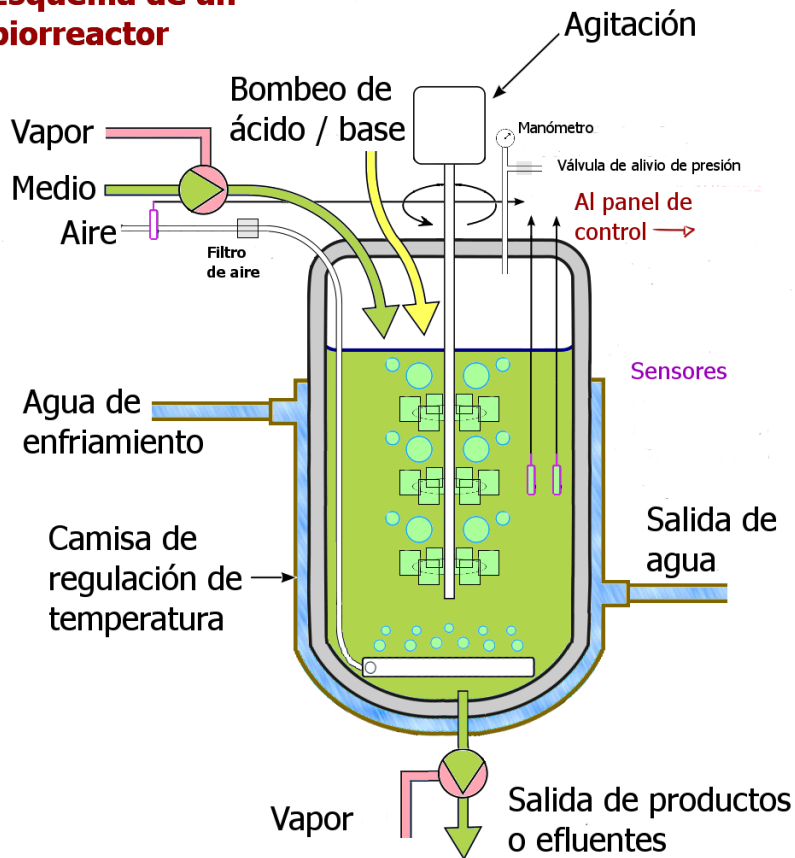


Figura 9: esquema general d'un bioreactor [14]

## 6.1 Aplicacions dels bioreactors

Les aplicacions a destacar dels bioreactors són[14]:

- La producció d'enzims, proteïnes i anticossos, que correspon a un procés per lots en el que s'omple el reactor per complet i un cop transcorregut el temps de reacció es torna a buidar. Les condicions ambientals com la pressió o el volum dels reactor s'han de monitoritzar per obtenir el producte desitjat.
- Tractament d'aire contaminat, conegut com a bio-depuració. En aquest cas, el bioreactor s'utilitza per eliminar els microbis que es troben en un corrent d'aire

contaminat.

- Depuració d'aigües residuals, ja siguin domèstiques o industrials.
- Biolixivació de minerals, cultiu de cèl·lules, enginyeria de teixits.

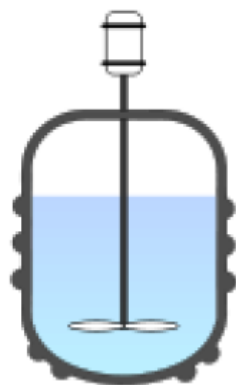
Un fermentador és un cas particular de bioreactor, el qual s'utilitza específicament per a processos de fermentació, amb la particularitat que no s'aireja durant el procés de reacció, per tant, el reactor roman aïllat de l'exterior.

## 6.2 Tipus de bioreactors

De bioreactors n'hi ha de molts tipus, per una banda trobem els fermentadors que s'utilitzen en cultius estàtics, com serien els tubulars, o els de flux de pistó entre els que trobem els de partícules. En aquesta part ens centrarem en els bioreactors que s'utilitzen en cultius agitats, que es classifiquen segons el mètode d'alimentació[15]:

### 6.2.1 Cultius en discontinu (Batch)

En aquest cas el creixement de microorganismes es duu a terme en un recipient tancat, com el de la *figura 10*, amb una concentració inicial, la qual no es modifica. Els nutrients s'afegeixen a l'inici i la fermentació finalitza quan el substrat s'acaba.

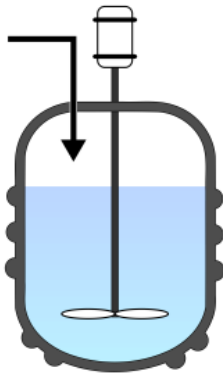


*Figura 10: esquema reactor discontinu[15]*

### 6.2.2 Cultius en semi-continu (Fed-Batch)

En aquest tipus d'alimentació, els nutrients s'afegeixen al cultiu al llarg de la reacció, com es mostra a la *figura 11* per permetre un major creixement o millorar l'eficiència de la producció.

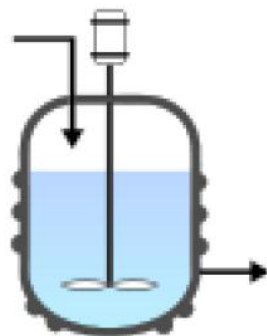
Els nutrients s'afegeixen esglaonadament a mesura que avança el procés, de manera que la concentració de nutrients ens manté constant. D'aquesta manera, es permet solucionar la limitació de creixement que presenta el reactor batch.



*Figura 11: esquema reactor semi-continu[15]*

### 6.2.3 Cultius en continu (CSTR)

En aquest cas el sistema de cultiu és obert. Els nutrients s'afegeixen de manera continua a l'interior del reactor, i extraient una quantitat equivalent a la introduïda tal i com es mostra a la *figura 12*. D'aquesta manera s'aporten al medi nutrients diferents i s'eliminen els ja utilitzats pels microorganismes. Això fa que els microorganismes es mantinguin en la fase de creixement durant més temps. Aquest procés es realitza a velocitat constant amb l'objectiu de mantenir el volum total del recipient invariable. El principal inconvenient d'aquest mètode d'alimentació, és la dificultat de mantenir l'esterilitat del medi.



*Figura 12: esquema reactor continu[15]*

## 6.3 Factors fisicoquímics que influeixen en el rendiment de les fermentacions

### - pH

El pH és el paràmetre més important a regular durant el creixement de microorganismes. A l'interior dels fermentadors, s'originen canvis de pH degut a l'activitat dels metabòlits cel·lulars, per això s'ha de tenir present l'addició de bases o àcids quan es detecta una variació per mantenir aquest paràmetre el més estable possible. El valor òptim de pH per al creixement de microorganismes depèn molt del tipus de microorganismes, però principalment es troba en un rang entre 5,5 i 8,5[16].

### - Oxigen dissolt

És molt important saber en tot moment la quantitat d'oxigen dissolt, ja que es tracta d'un dels productes metabòlics més importants que trobem en qualsevol reacció.

La quantitat aproximada d'oxigen en una solució saturada d'aquest gas seria de 9mg/L[17].

La solubilitat de l'oxigen es pot descriure amb la llei de Henry

$$c = H \cdot p(4)$$

C representa la quantitat d'oxigen dissolt, H és la constant de Henry, específica per cada gas i p és la pressió parcial del gas, en aquest cas l'oxigen.

### - Temperatura

La temperatura intervé en la velocitat de creixement dels microorganismes. Si es té una temperatura inferior a la desitjada, els microorganismes tardaran més en desenvolupar-se. Si per el contrari tenim una temperatura superior, es podria originar un xoc tèrmic amb la conseqüència que es reduiria el rendiment final del procés[18].

És recomanable doncs intentar mantenir una temperatura constant dins el reactor durant el procés de fermentació que permetin obtenir un bon rendiment.

S'ha de tenir present que la temperatura tendeix a augmentar degut a l'agitació i a

l'activitat metabòlica dels microorganismes, per això en algunes ocasions s'usen sistemes de refrigeració que ajuden a mantenir aquest paràmetre constant.

- **Agitació**

L'agitació és una de les accions més importants en els processos de fermentació ja que permet accelerar el contacte entre dues o més fases. El nivell d'agitació però ha d'estar dins l'òptim, ja que un nivell massa elevat podria provocar danys en el cultiu fet que provocaria una reducció del rendiment de la fermentació[19].

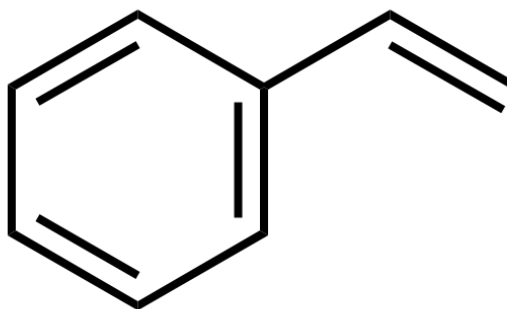


## 7 Teoria 4: L'estirè i el seu precursor, l'àcid cinnàmic

### 7.1 l'Estirè

L'estirè és un hidrocarbur aromàtic de fórmula  $C_8H_8$  tal i com es veu a la figura 13, i presenta un pes molecular de 104,14 g/mol [20].

Es un derivat orgànic del benzè i per tant es produeix industrialment en refineries.



Aquest compost molecular es coneix també com vinilbenzè, etenilbenzè, cinamè o feniletilè.

*Figura 13: estructura molecular Estirè [21]*

És un líquid incolor d'aroma dolça que s'evapora molt fàcilment. A vegades conté altres productes químics que li donen una aroma forta i desagradable.

Pel que fa a les seves propietats físiques presenta un punt de fusió de  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  i un punt d'ebullició de  $145\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Essent la seva densitat de 0,909 g/L a  $20^{\circ}\text{C}$  [21].

L'estirè presenta una estructura formada per una molècula d'etè  $\text{CH}_2=\text{CH}_2$ , en la que un dels dos hidrògens ha estat canviat per un grup fenil ( $\text{C}_6\text{H}_5$ ); es conserva el doble enllaç carboni-carboni de l'etè. Aquest doble enllaç fa que la molècula sigui especialment reactiva.

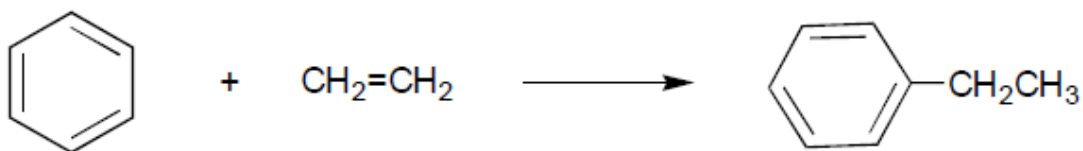
L'estirè dona lloc a la majoria de les reaccions de l'etè, en particular, les reaccions d'adició en les que es trenca el doble enllaç i els reactius s'uneixen als àtoms que el formaven.

És una molècula apolar, i per tant es dissolt fàcilment en alguns compostos líquids orgànics, però no es dissolt fàcilment en aigua.

A tot el món la indústria química va produir prop de 25 milions de tones d'estirè el 2010.

És el precursor de molts productes com cautxú, plàstics, material aïllant, canonades, parts d'automòbils envasos d'aliments entre altres.

L'estirè és produït per la indústria química a partir de l'etilbenzè. Aquest últim és un derivat aromàtic del benzè que s'obté per reacció del benzè amb etilè [22]. La reacció es mostra a la *figura 14*.

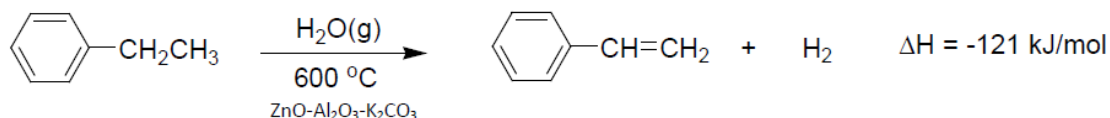


*Figura 14: reacció d'obtenció d'etilbenzè [22]*

Industrialment existeixen 2 mètodes per poder produir l'etilbenzè amb el qual es produirà posteriorment l'estirè:

- Procés en fase líquida: el qual es realitza a temperatures entre 140-200 °C i una pressió entre 3-10 bar. Com a catalitzador s'utilitza  $\text{AlCl}_3$ , el qual es gasta a raó de 0,25 kg per cada 1000 kg d'etilbenzè produït.
- Procés en fase gas: amb el qual es treballa a temperatures de 300°C i 40-65 bar. Com a catalitzador s'utilitza  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . En aquest procés s'ha de mantenir una relació molar d'etilè/benzè de 0,2, per evitar que s'introdueixi més d'una molècula d'etilè en l'anell de benzè.

Pràcticament tot l'etilbenzè que es produeix serveix per a produir estirè. Aquesta conversió es va a partir d'una reacció de deshidrogenació catalítica en presència de vapor [23] (*figura 15*):



*Figura 15:reacció d'obtenció de l'estirè [22]*

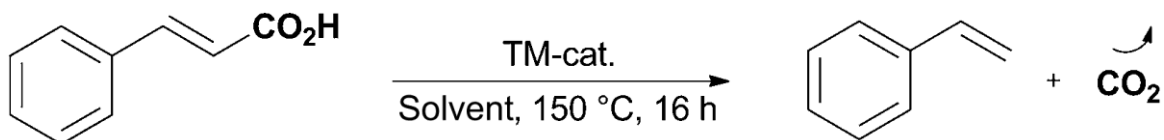
El catalitzador utilitzat es un sistema de tres components:  $\text{ZnO-Al}_2\text{O}_3\text{-K}_2\text{CO}_3$ . La presència de vapor d'aigua, es per reduir la pressió parcial de l'etilbenzè i afavorir la reacció.

### **Aplicacions [24]**

- S'utilitza en la producció d'una ampla gamma de polímers, entre ells el poliestirè, i diversos elastòmers copolímers com el cautxú de butadiè-estirè o l'acrilonitril-butadiè-estirè (ABS).
- S'utilitza en la producció de plàstics transparents.
- S'utilitza com a dissolvent i com a component dels combustibles per a automòbils.
- Té una resistència mecànica elevada i a l'impacta, cosa que permet que s'utilitzi en components d'automòbils o electrodomèstics.

## 7.2 Obtenció per síntesi

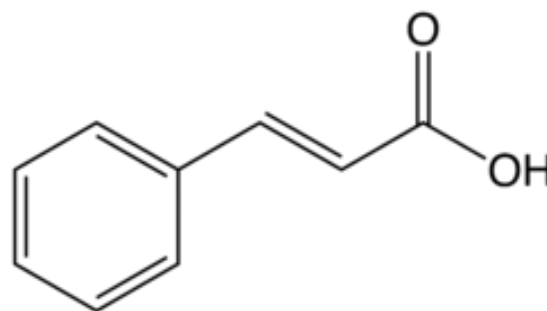
A nivell de laboratori, l'estirè es pot obtenir mitjançant descarboxilació de l'àcid cinnàmic[25] tal i com es mostra a la *figura 17*:



*Figura 16: síntesi d'estirè a partir d'àcid cinnàmic [25]*

### 7.2.1 L'àcid cinnàmic

L'àcid cinnàmic es un àcid orgànic de fórmula molecular C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub> (*figura 18*) i amb una massa molar de 148 g/mol. És un sòlid blanc cristal·lí que és lleugerament soluble en aigua.



*Figura 17: estructura molecular de l'àcid cinnàmic [26]*

Te un punt de fusió de 133 °C i un punt d'ebullició de 300°C, amb una densitat de 1,25g/cm<sup>3</sup>[26].

S'obté principalment de l'oli de canella, tot i que també es troba en balsàmics com el storax i també en la mantega de Karité i és utilitzat en certs fàrmacs i per a la fabricació dels esters metílic, etílic i benzílic per a la indústria de la perfumeria.

L'àcid cinnàmic es també una part molt important de les vies sintètiques de l'àcid shikímic, que és un metabòlit molt important en plantes i microorganismes. La seva biosíntesi es realitza a partir de l'acció de l'enzim fenilalanina amoníac-liasa (PAL) en fenilalanina.

## 7.3 Obtenció mitjançant vies biològiques

Com ja s'ha dit anteriorment, l'estirè pot ser sintetitzat a partir de l'àcid cinnàmic, per tant en aquest apartat ens centrarem en l'obtenció d'àcid cinnàmic mitjançant vies biològiques que posteriorment serà utilitzat per a produir estirè i així obtenir aquest producte de manera amigable amb el medi ambient.

En l'actualitat s'utilitzen 2 mètodes per a produir àcid cinnàmic[27]: (I) l'extracció directa de fonts vegetals com l'escorça de canyella i (II) síntesi química, però tots 2 mètodes presenten defectes que fan que no siguin adequats per a la producció a escala industrial.

En el cas de l'extracció de les plantes, la quantitat d'aquest àcid depèn de les condicions ambientals i el rendiment d'extracció no és prou alt. En el cas de la síntesi química, l'àcid cinnàmic es pot sintetitzar mitjançant la reacció de condensació entre benzaldehid i àcids orgànics, però aquest procés requereix de molta energia.

D'altra banda també requereix de derivats del petroli i actualment hi ha una gran pressió pública per substituir els derivats del petroli. S'estan desenvolupant vies alternatives amigables amb el medi ambient per a la producció de derivats del petroli.

En el cas de l'àcid cinnàmic, pot ser sintetitzat a partir de L-fenilalanina, la qual es sintetitza a partir de la via de shikimat(*figura 19*), que és una font important de compostos aromàtics. Llavors la L-fenilalanina es desamina mitjançant l'enzim fenilalanina amoníac-liasa(PAL)[28] .

Amb l'evolució de l'enginyeria metabòlica, alguns microorganismes com *E. coli*, *Streptomyces lividans*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Pseudomonas putida*, han estat utilitzats per a la producció d'àcid cinnàmic.

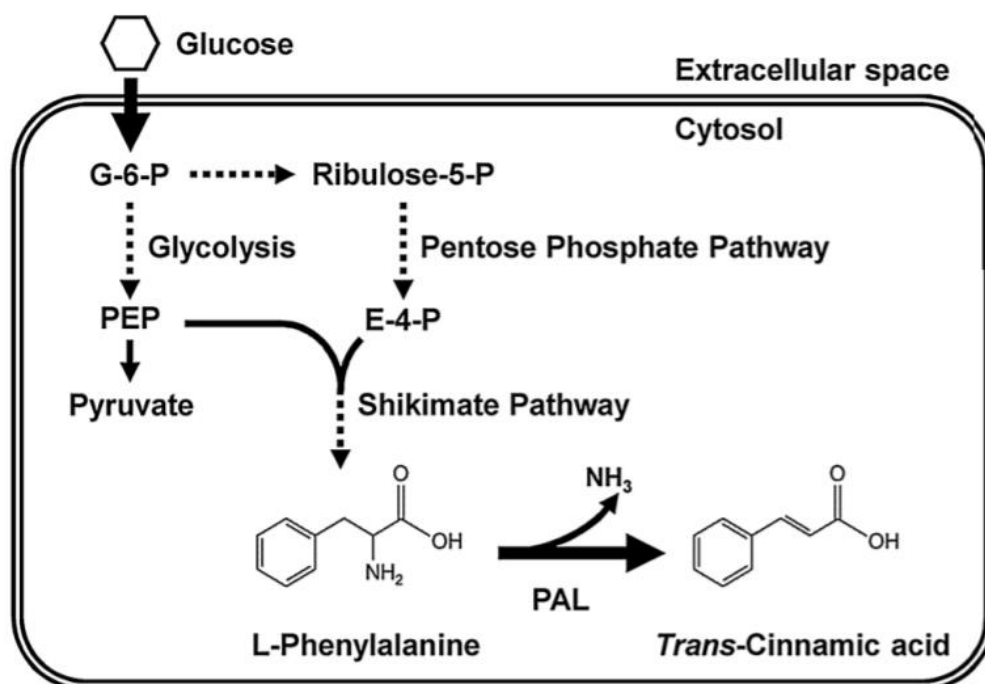


Figura 18: esquema de la via biocinètica de producció d'àcid trans-cinnàmic [27].

Aquest mètode és el que actualment es troba més desenvolupat per a l'obtenció d'àcid cinnàmic mitjançant vies que no incorporin derivats del petroli, tot i això el rendiment d'obtenció d'àcid no és molt elevat i es necessiten grans quantitats de reactius i temps per obtenir una quantitat decent d'àcid cinnàmic.

## 8 Teoria 5: estat de l'art de l'obtenció de l'àcid cinnàmic amb microorganismes.

### 8.1 Primer article

En un article de *Hyun Bae Bang*, publicat a la revista *Process Biochemistry*, es descriu un mètode d'obtenció d'àcid cinnàmic a partir del microorganisme *E.coli*, el qual ha estat modificat genèticament, introduint-li l'enzim fenilalanina amoníac-liasa (PAL), responsable de la síntesi de àcid cinnàmic a partir de L-fenilalanina.

La reacció es va duu a terme en un bioreactor fed-batch amb un volum de 5L. Les condicions de treball van ser les següents: la temperatura es va mantenir a 37°C, el pH constant amb un valor de 6,8 i amb una agitació de 1000 rpm. El tant per cent d'oxigen dissolt també es va mantenir constant al 40%.

Com a font de nutrients es va utilitzar una solució d'àcid casamino, el qual es una barreja d'aminoàcids i pèptids.

La reacció va durar 86 hores amb una concentració final d'àcid cinnàmic de 6,9 g/L.

### 8.2 Segon article

Aquest article es centren en la producció d'àcid cinnàmic usant el microorganisme *Streptomyces lividans*, el qual es modifica genèticament i se li introdueix l'enzim PAL.

L'experiment va ser realitzar usant diferents fonts de carboni. Quan es va utilitzar glucosa, la recció va durar 5 dies i es va obtenir una concentració d'àcid cinnàmic de 210 mg/L. Utilitzant glicerol, la concentració màxima assolida al cap de 6 dies va ser de 450 mg/L.

### 8.3 Tercer article

Es mètode de fermentació descrit per obtenir àcid cinnàmic, es a partir del substrat glucosa. Descriu una via alternativa a partir de l'àcid fenil-làctic, en la que no intervé l'enzim PAL.

En el procés de fermentació de la glucosa es forma fenilalanina i D-fenil-lactat. Llavors l'enzim, fenil-lactat deshidratasa, converteix aquest últim en àcid cinnàmic. Aquest enzim es troba en el microorganisme *Clostridium sporogenes*, el qual ha de ser introduït a les cadenes de *E. coli*.

Al cap de 125 hores de reacció es va obtenir una concentració d'àcid cinnàmic de 460 mg/L.



## 9 Materials i equips

Com que aquest es tracta d'un projecte de recerca bibliogràfica, no ha estat precis de disposar de matèria química específic ni d'un equip d'instrumentació de laboratori. Per aquest motiu, en aquest treball, els procediments de seguretat com per exemple el de tractament de residus s'enumeren de manera molt general.

El principal material utilitzat doncs, han estat articles científics i altre documentació extreta majoritàriament de llibre o revistes científiques i tecnològiques. També s'ha complementat la informació amb una recerca bibliogràfica a través de pàgines web que ha ajudat a entendre conceptes.

En la part pràctica del projecte, la qual consta de dissenyar un bioreactor per a produir àcid cinnàmic, s'ha utilitzat com a eina de treball el programa SolidWorks, un software de disseny assistit per ordinador (CAD).

Aquest programa permet modelar peces individuals i conjunt de peces en 3D i també obtenir-ne els plànols respectius.

A l'hora de realitzar el disseny, es requereix un estudi previ dels elements necessaris i els paràmetres de disseny essencial per presentar de manera virtual el bioreactor desitjat.



## 10 Resultats

Un cop exposada la part teòrica, s'ha fet un estudi dels diferents mètodes de producció de l'àcid cinnàmic per tal de poder dur a terme el disseny del bioreactor.

En aquest cas, segons les dades obtingudes a partir de dels articles estudiats, el millor mètode per obtenir àcid cinnàmic és a partir de la fermentació del llevat *E. coli*.

Aquest mètode és el que proposa K.J. Jeong en un dels seus articles publicats a la revista *Process Biochemistry*. A partir d'aquest article s'han deduït els volums i quantitats necessàries per dur a terme el procés de fermentació, que permetrà obtenir etilè a nivell d'escala pilot.

### 10.1 Selecció del fermentador i dades generals

El reactor escollit per dur a terme el procés de fermentació i obtenir àcid cinnàmic, és un bioreactor fed-batch, un reactor de tanc agitat alimentat per lots.

#### 10.1.1 Temperatura

La temperatura òptima per a que es produeixi el creixement del bacteri *E.coli* es troba en un rang entre 35-40 °C. En aquest experiment es pretén mantenir la temperatura en 37 °C. Per aconseguir-ho, s'utilitzarà una residència calefactora que permeti mantenir la temperatura desitjada, tenint en compte que la temperatura a l'interior del reactor pot augmentar degut a l'efecte de l'agitació.

El sistema de control de temperatura estarà connectat a un termòstat que alhora es trobarà connectat a la resistència elèctrica, procedint a la seva activació en cas que fos necessari.

El termòmetre escollit és del model TH310 [29] com el de la *figura 20*, un dels més utilitzats en l'àmbit de laboratori.



*Figura 19: termòmetre TH310[29]*

### 10.1.2 pH

El valor òptim de pH per a la producció d'àcid cinnàmic a partir del bacteri *E. coli*, és de 6-7. En el nostre cas es pretén mantenir el valor de pH constant en 6.8, això s'aconsegueix addicionant una solució d'amoníac al 25% en volum. Aquesta adició es farà automàticament quan el valor de pH baixi de 6,7.

A la cúpula superior del bioreactor, es dissenyarà una obertura en la qual es podrà introduir un sistema de control de pH, com és el cas d'un pH-metre com es mostra a la figura 21.



*Figura 20: pH-metre[30]*

### 10.1.3 Cultiu, manteniment dels microorganismes i substrat

El cultiu es prepara en un medi de fenilalanina que conte una concentració de 3 g/l d'extracte de llevats. Al cap de 12 hores de cultiu, s'inocula mitjançant un medi amb una concentració de 100mg/l de ampicilin i 40 mg/l de kanamycin.

Finalment com substrat, s'utilitza una solució que conté 50g/l de glucosa i 20 g/l de casamino àcid, que es tracta d'una barreja de diferents aminoàcids i pèptids obtinguts de la hidròlisi de la caseïna.

### 10.1.4 Subministrament d'oxigen

Com en qualsevol reacció de fermentació aeròbica, és essencial una aportació constant d'oxigen.

És un paràmetre atènyer en compte ja que el rendiment de la reacció es pot veure afectat si el nivell d'oxigen disponible no és l'adequat.

En aquest cas, el nivell d'oxigen dissolt s'intenta mantenir com a mínim al 40%, d'aquesta manera s'aconseguirà que l'oxigen no actuï com a reactiu limitant.

## 10.2 Paràmetres de disseny

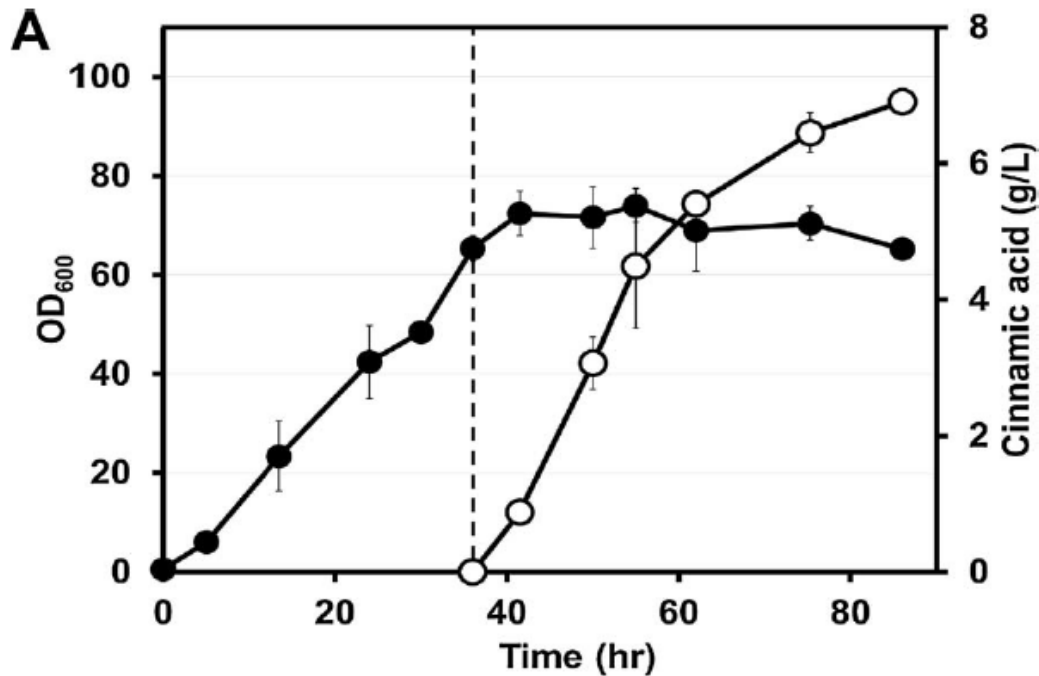
### 10.2.1 Càlcul de la capacitat de producció i volum del bioreactor

Per tal de poder dimensionar el bioreactor, és necessari determinar la producció prevista en un període de temps. En aquest cas s'ha establert una producció anual de 250 kg d'àcid cinnàmic.

També s'ha determinat que la planta pilot treballarà 300 dies a l'any que correspon a 50 setmanes. Amb aquestes dades es pot calcular la producció setmanal i el volum que haurà de tenir el reactor per satisfer aquesta producció prevista.

$$P_{setmana} = 250 \frac{Kg \text{ àcid cinnàmic}}{any} \cdot \frac{1 any}{50 setmanes} = 5 \frac{Kg \text{ àcid cinnàmic}}{setmana} \quad (5)$$

Amb les condicions de treball de l'article, s'aconseguia una concentració de 6,9 g/l d'àcid cinnàmic després de 3,6 dies de fermentació tal i com es mostra a la *figura 22*.



*Figura 21: concentració obtinguda d'àcid cinnàmic al final del procés [27].*

En el nostre cas, per tal d'optimitzar la producció, realitzarem fermentacions de 3 dies, amb un temps mort entre fermentació i fermentació de mig dia que estarà destinat al manteniment de la planta pilot. D'aquesta manera es realitzarien dues fermentacions per setmana.

La concentració obtinguda d'àcid cinnàmic després de 3 dies de fermentació és de 6 g/l, un valor no gaire distant del que s'aconsegueix si es deixa la reacció els 3,6 dies.

El cicle de treball establert és:

Dilluns	Dimarts	dimecres	dijous	divendres	dissabte	diumenge

Per tant la primera fermentació de la setmana serà entre la segona meitat del dilluns i la primera meitat del dijous i la segona fermentació anirà de divendres a diumenge.

$$P_{\text{fermentació}} = 4 \frac{\text{Kg àcid cinnàmic}}{\text{setmana}} \cdot \frac{1 \text{ setmana}}{2 \text{ fermentacions}} = 2 \frac{\text{Kg àcid cinnàmic}}{\text{fermentació}} \quad (6)$$

Amb aquesta dada i la dada de concentració d'àcid cinnàmic que s'obté després de cada fermentació podem calcular el volum que haurà de tenir el bioreactor.

$$V_{\text{bioreactor}} = 2,5 \frac{\text{Kg àcid cinnàmic}}{\text{fermentació}} \cdot \frac{1 \text{ L}}{0,0075 \text{ Kg àcid cinnàmic}} = 333,3 \text{ L} \quad (7)$$

Per tant el volum eficaç del fermentador serà de 333 L, però s'ha de tenir en compte que el volum útil del bioreactor és aproximadament el 80% del volum total, per tant, el volum total del fermentador serà de 400 L.

### 10.2.2 Geometria

Un cop determinat el volum de bioreactor necessari per a satisfer la producció d'àcid cinnàmic, és necessari calcular la geometria del bioreactor, definint primerament l'alçada i el diàmetre.

S'ha de tenir en compte que el volum total trobat anteriorment, es repartirà entre el cos cilíndric i els casquets superior i inferior.

El primer pas és considerar el bioreactor com un cos purament cilíndric, i amb una alçada obtinguda es plantejaran les alçades dels casquets.

També es tindrà en compte que en aquest tipus de reactors el diàmetre del reactor sol ser aproximadament el 66% de l'alçada.

$$V_F = \frac{\pi}{4} \cdot D^2 \cdot H \quad (8)$$

$$D = \frac{2}{3} \cdot H \quad (9)$$

$$V_F = 400 \text{ L}$$

Per tant obtenim les mesures de la part cilíndrica del reactor:

$$H = 1050 \text{ mm}$$

$$D = 700 \text{ mm}$$

### 10.2.3 Càlcul geometria casquets [32]

Ara a partir d'aquestes primeres mesures calculades, podem tenir una idea de quines seran les dimensions finals del reactor, i a partir d'aquestes prenem la decisió de que els casquets tindran una alçada de 12 cm.

$$V_F = \frac{\pi}{4} \cdot D^2 \cdot H + 2 \cdot \frac{\pi \cdot h^2}{3} \cdot \left(3 \cdot \frac{D}{2} \cdot h\right) \quad (10)$$

Amb la relació existent entre diàmetre i altura, obtenim l'equació:

$$V_F = \frac{\pi}{4} \cdot D^2 \cdot \frac{3}{2} D + 2 \cdot \left( \frac{\pi \cdot h^2}{3} \cdot \left(3 \cdot \frac{D}{2} - h\right) \right) \quad (11)$$

$$0.4 = \frac{\pi}{4} \cdot D^2 \cdot \frac{3}{2} D + 2 \cdot \left( \frac{\pi \cdot 0.12^2}{3} \cdot \left(3 \cdot \frac{D}{2} - 0.12\right) \right) \quad (12)$$

Obtenim que:

$$D = 650 \text{ mm}$$

$$H = 975 \text{ mm}$$



### 10.2.4 Material

Pel que fa al material del fermentador, s'utilitzarà acer inoxidable, degut a les seves capacitats físiques i químiques. Especialment a destacar la seva resistència a la corrosió. L'acer més típic per al muntatge d'equips és l'acer 316 [31].

EL gruix dels bioreactors de dimensions pilot que utilitzen acer com a material de construcció acostumen a utilitzar gruixos entre 2 i 5 mm. Això és degut a que no són equips molt pesats ni tampoc han de suportar pressions molt elevades, fins i tot sovint els reactors estan oberts a l'atmosfera, per tant no requereixen un gran gruix.

Aquest projecte és un d'aquests casos i per tant, tenint en compte els possibles efectes de corrosió, s'agafa un gruix de 3 mm.

### 10.2.5 Sistema d'agitació

Una de les parts més importants del fermentador és el sistema d'agitació, el qual ajuda a aconseguir unes mateixes condicions de composició, temperatura, aeració, pH, etc, en qualsevol punt del volum de la mescla dins el reactor.

Per poder dimensionar el sistema d'agitació, és necessari saber les dimensions bàsiques del bioreactor, i a partir de les quals, amb les relacions geomètriques que es mostren a la figura 23 es podrà dimensionar el sistema d'agitació.

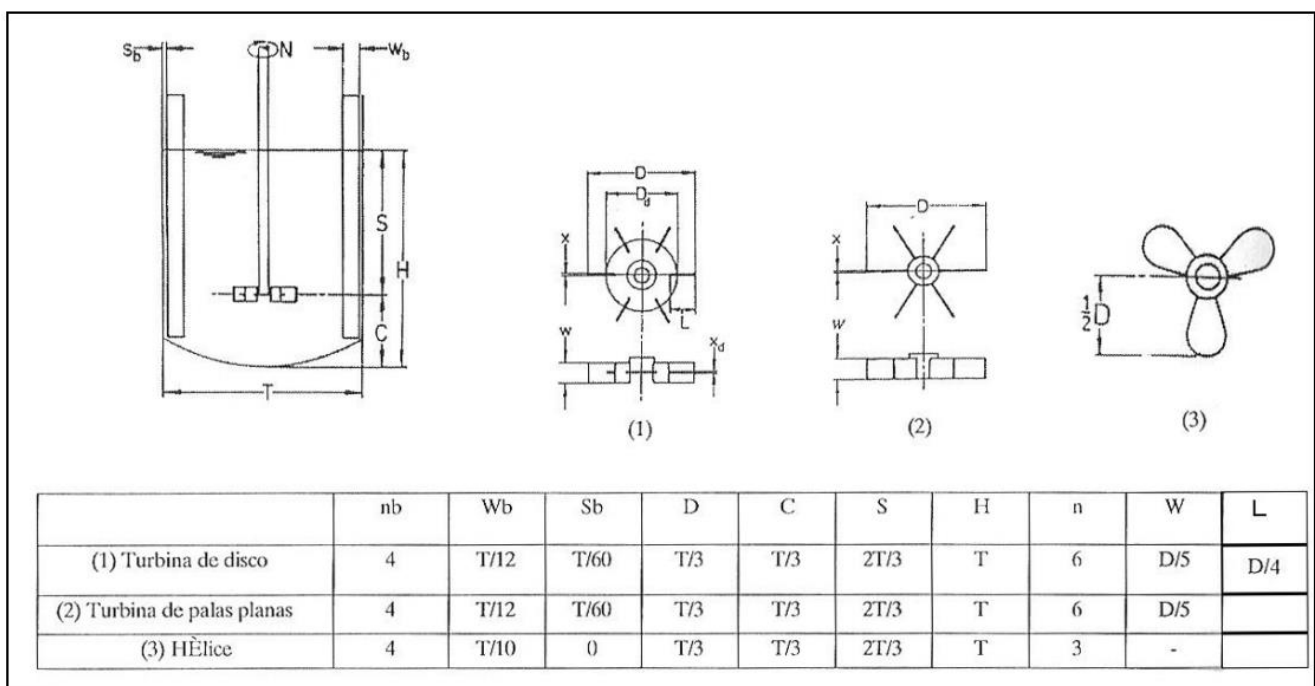


Figura 22: relacions geomètriques del sistema d'agitació d'un bioreactor. [33]

A la figura 24 es mostra de manera més clara a que correspon cada un dels paràmetres necessaris per al dimensionament del sistema d'agitació.

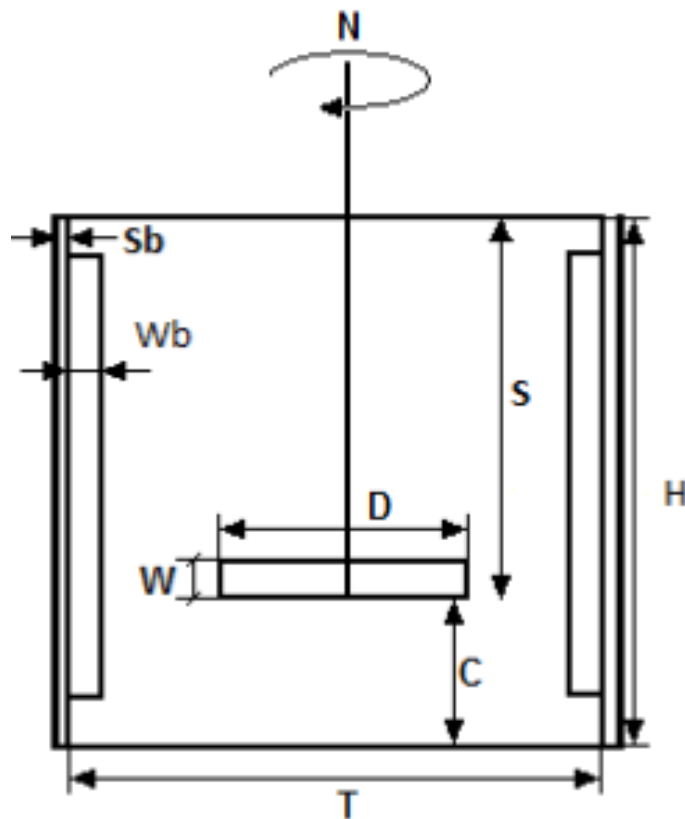


Figura 23: paràmetres sistema agitació[34]

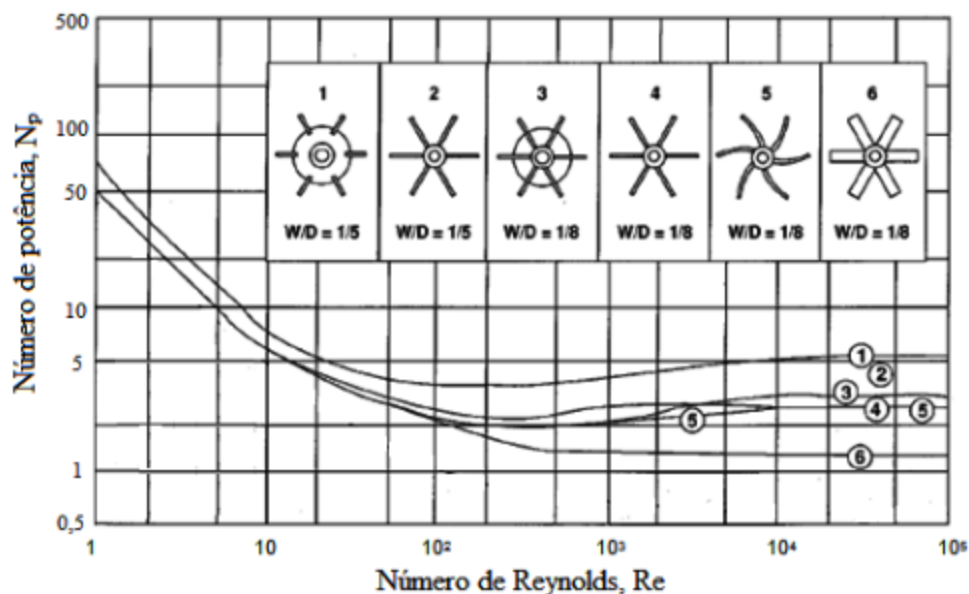
	Nomenclatura	Relació	Valor (m)
<b>Diàmetre del bioreactor</b>	T	-	0,65
<b>Altura del bioreactor</b>	H	-	0,975
<b>Número de deflectors</b>	nb	-	4
<b>Deflectors</b>	Wb	$T/12$	0,055
<b>Diàmetre de l'agitador</b>	D	$T/3$	0,22
<b>Distància</b>	C	$T/3$	0,22

<b>agitador-base del bioreactor</b>			
<b>Longitud útil de l'agitador</b>	S	$2T/3$	0,4
<b>Número d'àleps</b>	n	-	6
<b>Amplada d'àlep</b>	W	$D/5$	0,04

Taula 1: dimensions geomètriques sistema agitació

### 10.2.6 Motor

Un cop calculades les dimensions del sistema d'agitació serà necessari determinar la potència que consumirà el motor. Per al càlcul s'utilitzen els números de potència i Reynolds i el següent gràfic.

Figura 24: gràfic  $Re$  vs  $N_{po}$  per diferents turbines[35]

En aquest projecte utilitzarem una hèlix com la del perfil 2, que es mostra a la figura 25 principalment per la senzillesa de la geometria.

Un cop triada l'hèlix passem a calcular el nombre de Reynolds que ens servirà posteriorment per associar un numero de potencia.

Per a simplificar el càlcul assumim que les propietats del fluid seran similars a les de l'aigua.

$$Re = \frac{\rho \cdot N \cdot D^2}{\mu} = \frac{1000 \cdot 8.06 \cdot 0.22^2}{1 \cdot 10^{-3}} = 278763 \quad (13)$$

Mirant el gràfic, obtenim un numero de potència de 5, per tant, podem calcular la potencia a partir de:

$$N_{po} = \frac{P}{\rho \cdot N^3 \cdot D^5} \longrightarrow P = 1350 \text{ W} \quad (14)$$

Suposem però un rendiment del 70 %:

$$P_C = \frac{P}{\eta} = \frac{1350}{0.8} = 1688 \text{ W} \quad (15)$$

Per assegurar-nos del bon funcionament del sistema d'agitació s'usarà un motor de 2 kW.

### 10.2.7 Sistema d'aeració

El procés d'aeració és molt important en les fermentacions aeròbiques. Aquest procés està caracteritzat pel coeficient de transferència d'oxigen entre la fase líquida i la fase gas.

L'oxigen ha de ser subministrat contínuament al cultiu per tal de mantenir una població activa. Per que això passi l'oxigen ha de ser transferit des de la fase gas a la fase líquida, on el microorganisme el pot utilitzar.

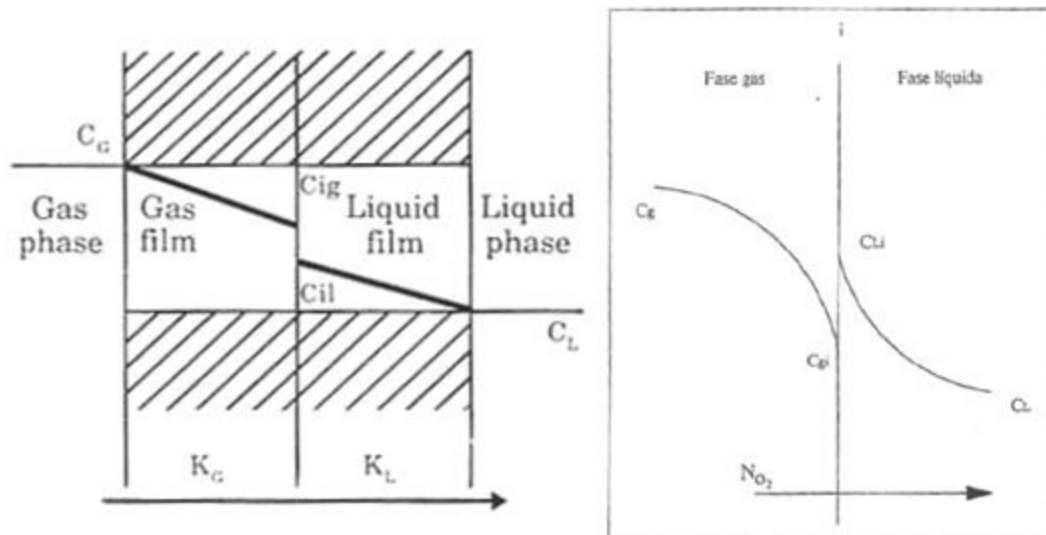


Figura 25: Esquema de transport d'oxigen des de la fase gas a la fase líquida. [36]

Una consideració a tenir en compte, és que la solubilitat de l'oxigen és baixa, per sota dels 10mg/l. Per tant, el fermentador s'haurà d'alimentar amb un cabal d'oxigen suficientment gran per evitar que aquest no sigui el reactiu limitant del procés.

Per tal d'evitar que això passi, s'estipula un flux d'aire de 1vvm (volum d'aire per volum de fermentador i minut) [33], d'aquesta manera s'assegura una bona oxigenació.

Llavors, per calcular el cabal d'aire d'entrada al bioreactor, és necessari el volum del bioreactor, calculat anteriorment.

$$Q_{aire} = 1 \frac{m^3}{m^3 reactor \cdot minut} \cdot V_{reactor} \quad (16)$$

$$Q_{aire} = 1 \frac{m^3}{m^3 reactor \cdot minut} \cdot 0,4 m^3 = 0,4 \frac{m^3}{minut} = 400 \frac{l}{minut} \quad (17)$$

## 10.3 Elements addicionals

### 10.3.1 Obertures i ports

El bioreactor disposarà de 8 ports a la tapa superior, quatre de grans i quatre de petits. Els ports de major diàmetre són aquells per on entrarà l'alimentació, els reactius i en el cas que en algun moment fos necessària l'addició de medi, aigua o qualsevol altre element.

Així mateix compta amb un conducte per a l'entrada de l'aire (sistema d'aeració), també a la tapa del bioreactor, el qual disposa d'una vàlvula de bola per a poder regular el cabal d'aire d'entrada.

A continuació es fa una descripció més detallada de les consideracions que s'han dut a terme a l'hora de dissenyar els ports i escollir-ne la ubicació:

El port de l'agitador es trobarà a la tapa superior, concretament a l'eix de revolució del bioreactor.

La sortida serà una obertura ubicada al casquet inferior, també concèntric per facilitar l'extracció de l'àcid cinnàmic obtingut. Aquesta sortida estarà equipada amb una vàlvula de bola que permetrà regular el cabal de sortida.

A la tapa superior també trobarem una obertura a l'atmosfera, que estarà relacionada amb l'aeració del bioreactor. Gràcies a aquesta obertura, s'evitaran sobrepressions i es podrà alliberar aire subministrat. Per seguretat, en l'obertura s'instal·larà un filtre d'aire per evitar la sortida de qualsevol element de l'interior del fermentador. Així mateix també compta amb un port per a l'entrada d'aire, el qual disposa d'una vàlvula de bola per a poder regular el cabal.

Els ports restants, es trobaran al casquet superior del bioreactor i tindran un diàmetre menor als esmentats fins ara:

Primer de tot trobem 2 ports que serveixen per a la operativa del sistema de control de pH, un per la incorporació del pH-metre i l'altre per a l'adició de la solució reguladora de pH en el cas que fos necessària.

Troblem també un port destinat a la lectura de la temperatura, per on es posarà el termòmetre.

Finalment es disposarà de d'un port auxiliar, que en un principi no es preveu un ús concret però podrien ser útils per l'extracció d'alguna mostra de líquid.

### 10.3.2 Vàlvules

Com ja s'ha comentat anteriorment, alguns ports porten incorporades vàlvules per regular el cabal, en aquest cas les vàlvules escollides són del tipus bola, com la que

s'observa a la *figura 27* ja que són econòmiques i les més habituals.

En total caldran 3 vàlvules, una per a la sortida situada al casquet inferior, una per al port d'alimentació i l'última per al sistema d'aeració.



*Figura 26: Vàlvula de bola [37]*





### 10.3.3 Fixació casquet superior

A diferència del casquet superior, el qual se soldarà al cos cilíndric i no hi ha cap interès en que es pugui obrir, el casquet superior sí que és interessant que es pugui obrir, per facilitar la neteja del reactor. D'aquesta manera, el casquet superior s'acobla al cos cilíndric amb cargols.

### 10.3.4 Neteja

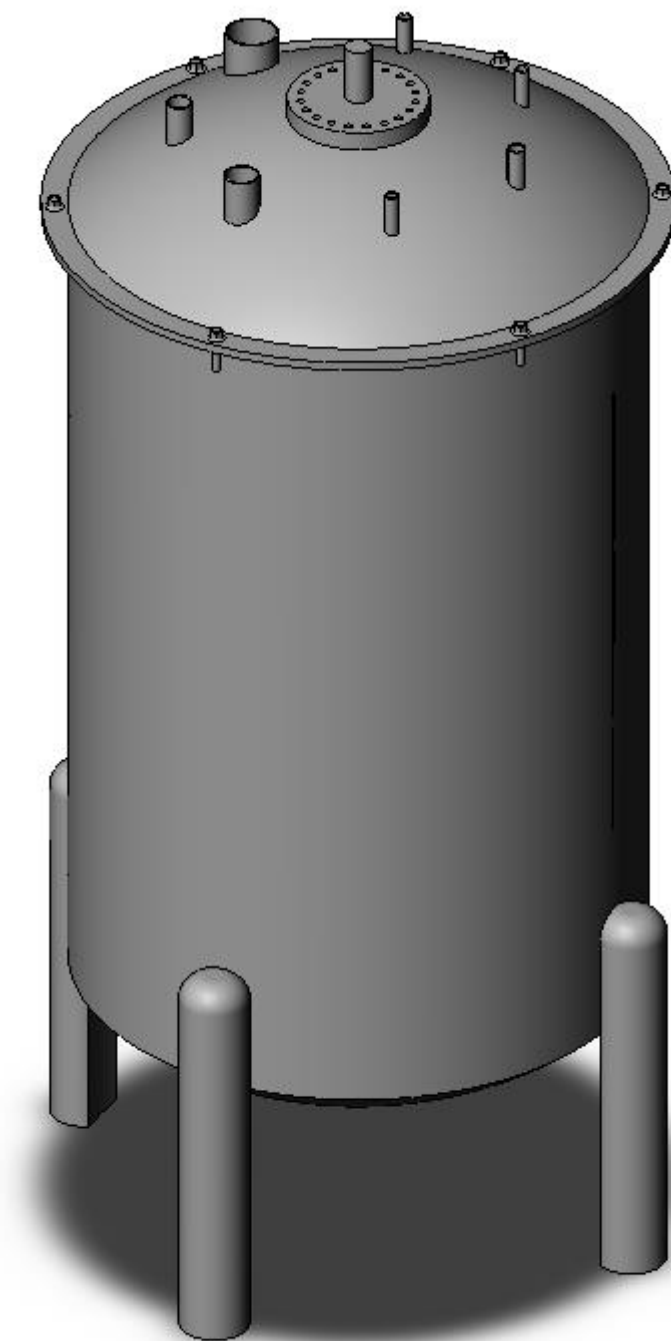
Entre cada període de producció serà necessari una neteja, aquesta activitat està compresa dins els períodes de preparació que hi ha entre lots de producció.

El més adequat serà dur-ho a terme en dues etapes: En primer lloc s'haurà de fer passar aigua amb clor per desinfectar i eliminar qualsevol resta d'agent biològic dins del bioreactor.

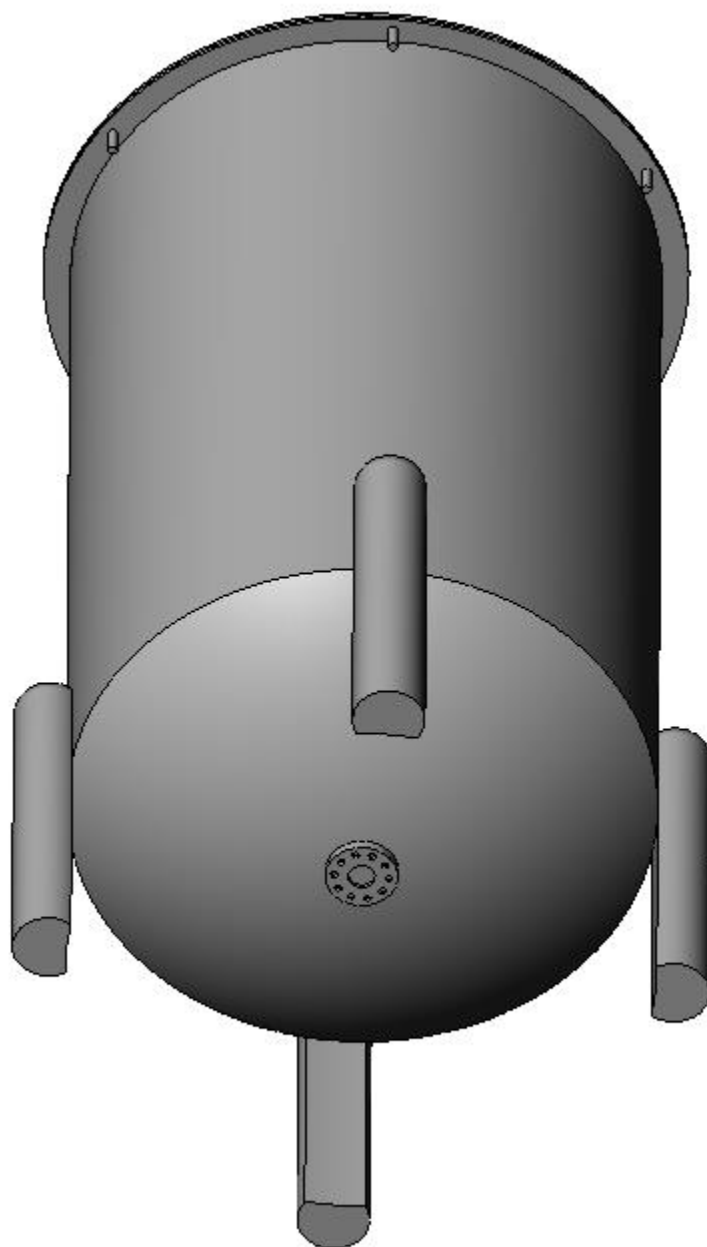
El més habitual i barat és fer servir lleixiu comercial i rebaixar-lo amb aigua de xarxa. Sovint el lleixiu comercial és d'una concentració del 5% i el més habitual es fan les neteges amb un 1%. Simplement s'omplirà el reactor amb aquesta dissolució, es deixarà una estona (per exemple 30 minuts) i després es buidarà. En segon lloc, s'utilitzarà vapor d'aigua a pressió per fer un últim rentat, especialment per poder accedir als racons més amagats de l'interior del reactor:

## 11. Disseny del bioreactor

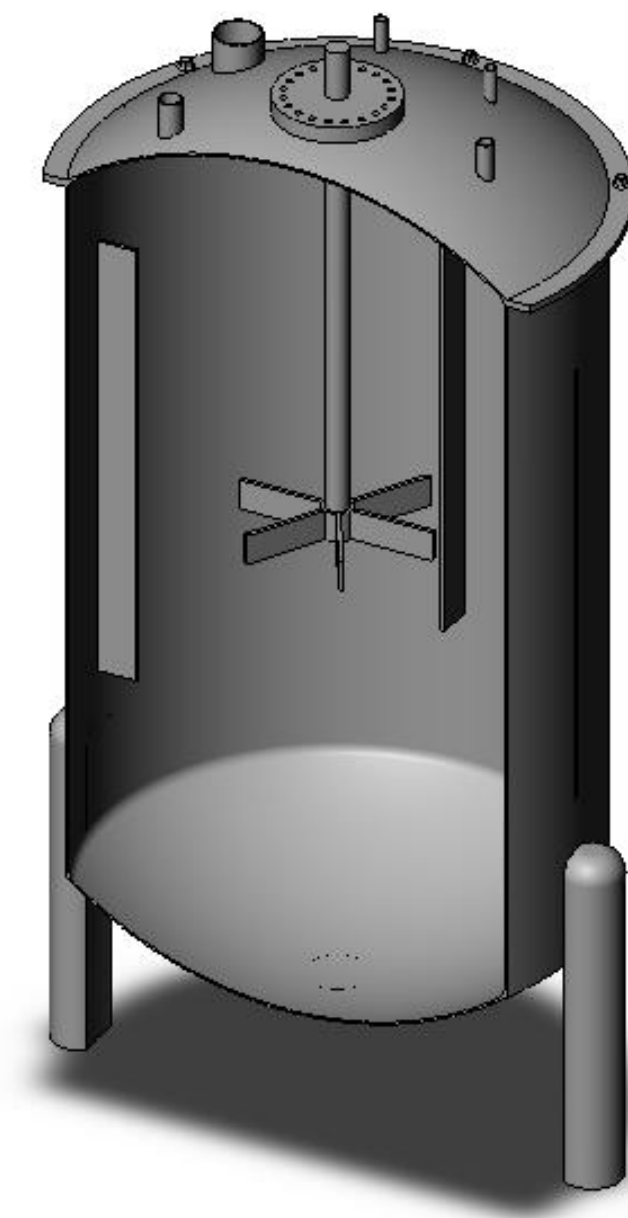
### 11.1 Disseny 3D



*Figura 27: Vista genérica del bioreactor*

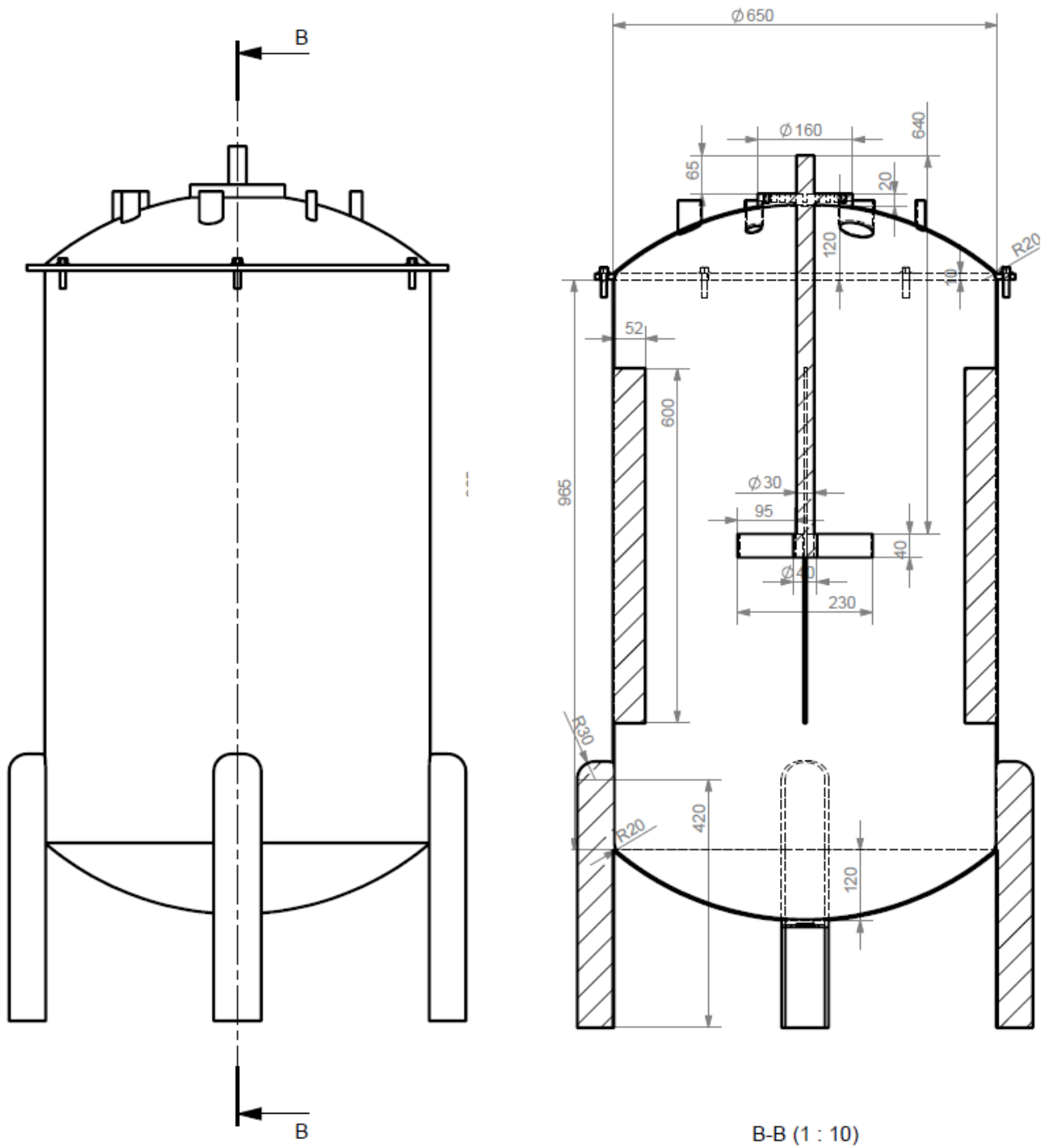


*Figura 28: vista de la part inferior del bioreactor*



*Figura 29: vista seccionada del bioreactor*

## 11.2 Plànols



*Figura 30: seccionat del bioreactor en dièdric. Cotes en mm*

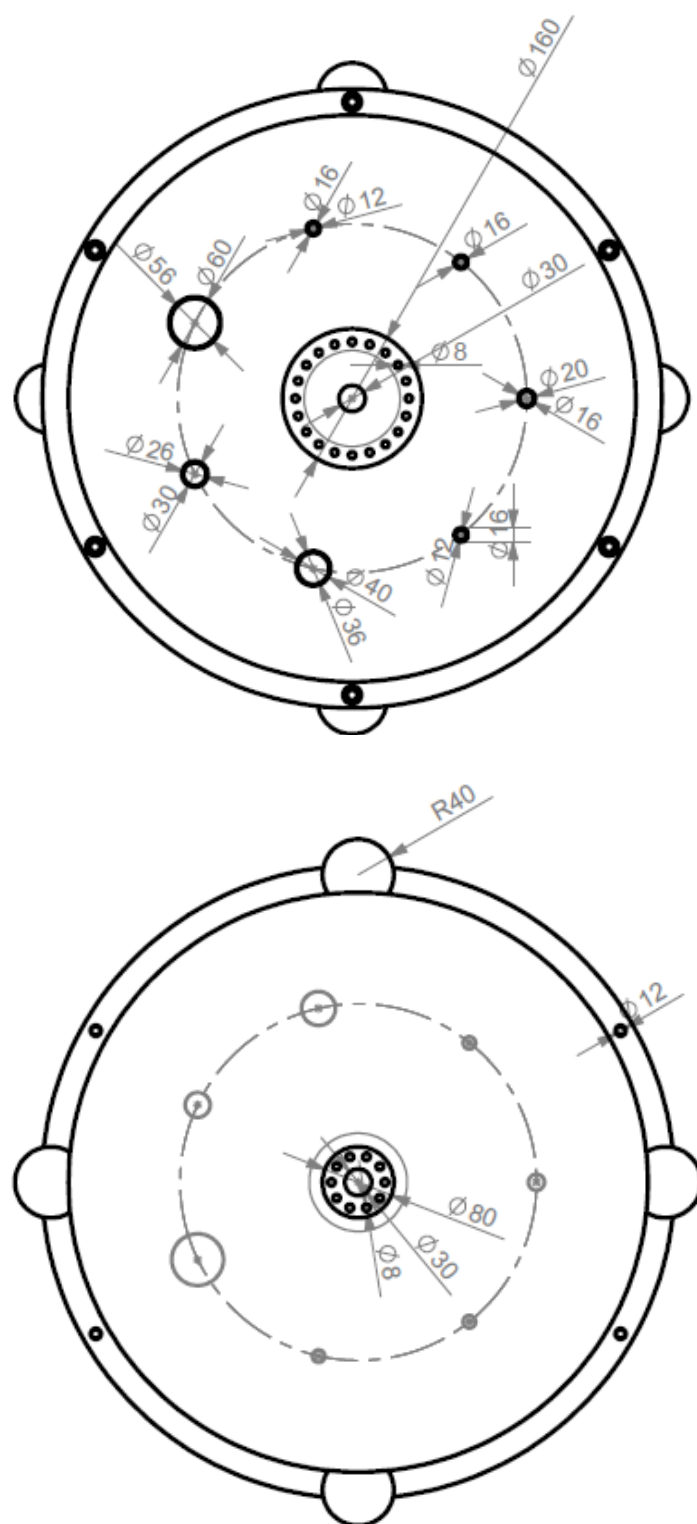


Figura 31: ports d'entrada i sortida. Cotes en mm

## 12. Seguretat

Un dels principals punts en els quals es centra la seguretat és en l'aspecte microbiològic. El bacteri de treball escollit és *E. coli*. Aquest bacteri segons la classificació dels grups de risc desenvolupada per la OMS, pertany al grup de risc 2. Tal i com es mostra a la figura 38.

**BIOSLab** EJEMPLOS DE MICROORGANISMOS EN LA RELACIÓN ENTRE: **GRUPOS DE RIESGO OMS** / **NIVELES DE BIOSEGURIDAD**  
CLASIFICACIÓN MICROORGANISMOS INFECCIOSOS CLASIFICACIÓN DE LABORATORIOS Y ANIMALARIOS

GRUPO DE RIESGO	GRUPO 1		GRUPO 2		GRUPO 3		GRUPO 4	
NIVEL DE BIOSEGURIDAD	BSL-1		BSL-2		BSL-3		BSL-4	
<b>BACTERIAS</b>	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Xylophilus ampelinus</i>		<i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus suis</i>		<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Yersinia pestis</i>			
<b>VIRUS</b>	Virus del Mosaico del Tabaco Bacteriófagos		Virus de Epstein-Barr Coronaviridae		Virus de inmunodeficiencia humana Virus de la Fiebre amarilla		Virus Ébola Virus de la Viruela	
<b>HONGOS</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Penicillium roqueforti</i>		<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Candida albicans</i>		<i>Histoplasma capsulatum</i> var <i>capsulatum</i> <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>			
<b>PARÁSITOS</b>	<i>Ditylenchus dipsaci</i> <i>Tylenchulus semipenetrans</i>		<i>Trichinella spiralis</i> <i>Toxocara canis</i>		<i>Echinococcus granulosus</i> <i>Taenia solium</i>			

Figura 32: Grups de risc de microorganismes [38]

Per tant es considera un microorganisme patògen que pot arribar a ocasionar infeccions, tot i això existeixen mesures preventives i el risc de propagació és molt baix.

Per tant a l'hora de treballar amb el bacteri s'haurà de tenir especial cura. A la zona de treball estarà prohibit menjar i veure. La zona de treball ha d'estar ben il·luminada i ventilada.

A part s'haurà de comptar amb un sistema de netejador d'ulls i dutxes per casos d'emergència.

### 12.1 Equips de protecció individual

Els equips de protecció individual són imprescindibles per tal de poder augmentar la seguretat el màxim possible. Pel que fa a aquest projecte, el material requerit és:

- Bata de laboratori: Per evitar taques, vessaments i esquitxades.
- Guants de seguretat: També per evitar contacte amb qualsevol substància isobretot per evitar el contacte directe amb la pell o ferides. Solen ser de làtex.



- Ulleres de laboratori: També per evitar esquitxades als ulls. Tot i disposa de netejador d'emergència d'ulls, se n'ha d'evitar l'ús el màxim possible. També pot minimitzar la irritació als ulls en els moments en els que es fan les neteges, per exemple.
- Guants mecànics: Tot i que no hi haurà cap activitat mecànica molt exigent, potser bona idea disposar d'un parell de guants mecànics, per fer anar les vàlvules, però sobretot, per si s'han de fer tasques d'acoblament o fer servir eines, es minimitzen els riscos de patir alguna lesió.
- Calçat de protecció: Òbviament s'ha de treballar sempre en entorns de laboratori amb sabata tancada, però si a més hi poden haver tasques de mecànica o fontaneria, possiblement val la pena disposar de sabates de seguretat, reforçades per si alguna eina, material o qualsevol altre element caigués a sobre de l'operari. A més, també són útils per evitar taques o esquitxades.
- Gorra de seguretat/mascareta: Quan es facin tasques en les que el reactor estigui obert, és necessari fer servir gorra de seguretat per evitar que cabells de cap o de barba puguin caure a l'interior.

## 12.2 Fitxa de seguretat de l'àcid cinnàmic

S'ha de tenir en compte les característiques del producte obtingut en la fermentació:

Producte	Àcid cinnàmic
Fórmula molecular	$C_9H_8O_2$
Nº CAS	140-10-3
Densitat	1,25 g/cm <sup>3</sup>
Massa molar	148,16 g/mol
Punt de fusió	133 °C
Punt d'ebullició	300°C



<b>Aparença</b>	Cristalls blancs
<b>Solubilitat en aigua</b>	500mg/L (25 °C)
<b>Estat</b>	Sòlid
<b>NFPA 704</b>	
<b>perills</b>	
<b>Punt inflamació</b>	166 °C
<b>Perills per a la salut</b>	Pot causar irritació als ulls
<b>Emmagatzematge</b>	Temperatura ambient, zona seca i ventilada

*Taula 2: fitxa seguretat àcid cinnàmic [37]*

També cal tenir present que s'utilitzarà una solució reguladora de pH, la qual pot ser irritant en contacte amb la pell o fins i tot corrosiu. D'igual manera, durant la neteja del bioreactor també s'ha de vigilar amb els productes utilitzats o els gasos que poden despendre.

## 13. Estudi econòmic

L'anàlisi econòmic d'un projecte és una part molt important del mateix. La disponibilitat de capital està lligada a les característiques dels materials i components seleccionats per a la realització del projecte, en el nostre cas un bioreactor.

Es planteja l'estudi econòmic com un estudi on s'assumeixen tots els costos durant tot un any i d'aquesta manera veure si és viable. Aquest estudi inclou el cost de l'equip, detallant el preu de tots els components, i el cost del treball de l'enginyer assignat a la realització del projecte.

En el nostre cas no deixa de ser un estudi de caràcter orientatiu ja que s'ha realitzat a partir d'un projecte a escala pilot. De manera que si es volgués estudiar per a una implementació a nivell de producció industrial, s'hauria de fer un estudi més acurat.

Com a mesura preventiva de la possible aparició de costos addicionals, s'ha tingut en compte un augment del 15% del cost total del bioreactor.

El preu final del bioreactor per a produir 250 kg d'àcid cinnàmic l'any a partir de glucosa mitjançant la fermentació de *E. coli* és de **15328,5 €**. El cost final del projecte amb un IVA inclòs del 21% és de **18547,5 €**.

A continuació es mostra una taula tots els costos desglossats.

### 13.1 Cost del projecte

	Component	preu	Unitats	Quantitat	Preu (€)
<b>Bioreactor</b>	Vas	70 <sup>1</sup>	€/kg	56,94 kg	3985,65
	Casquets	70	€/kg	27,2 kg	1904
	Deflectors	70	€/kg	0,175 kg	12,25
Agitació	Motor agitació	625	€/u	1u	625
	Agitador	70	€/u	1u	70
Aeració	Filtre aire	9,99	€/u	1u	9,99
	compressor	28,5	€/u	1u	28,5
Altres sistemes de control	pH-metre+ dosificador	95,9	€/u	1u	95,9
	Termòmetre	10,99	€/u	1u	10,99
	Resistència	49,9	€/u	1u	49,9

<sup>1</sup>El preu establert per als components del bioreactor es una estimació del preu fixat per a l'acer 316.

Altres	Cargols	4,99	€/u	6u	29,94
	Vàlvula de bola	70,9	€/u	3u	212,17
Manipulació	Operació de fabricació	20	€/h	40 hores	800
Extres	imprevistos			10%	575,32
Total bioreactor	Cost total bioreactor				6328,49
Personal	Hores enginyeria	15	€/h	600 hores	9000
TOTAL					15328,5

*Taula 3: estudi econòmic detallat*

## 14. Estudi d'impacte ambiental

Una de les grans preocupacions en l'àmbit científic, és l'impacte ambiental com a conseqüència de la realització d'un projecte.

Aquest projecte des d'un inici s'ha plantejat obtenir àcid cinnàmic mitjançant vies naturals, de manera que pugui ser una alternativa viable a l'actual via d'obtenció d'àcid cinnàmic a partir de derivats del petroli.

Tot i ser un projecte amigable amb el medi ambient, en el procés de fermentació es generarà CO<sub>2</sub> degut a l'ús del bioreactor.

### 14.1 Càlcul de les emissions del procés

En primer lloc es calculen les emissions de CO<sub>2</sub> generades pel motor d'agitació. Anteriorment ja hem calculat que el motor tindrà una potència de 3 kW. Ara hem de tenir en compte que treballarà 300 dies a l'any durant 24 hores al dia:

$$3 \text{ kW} \cdot 300 \text{ dies} \cdot 24 \text{ hores} = 14400 \text{ kWh} \quad (18)$$

També cal calcular el consum elèctric de la resistència elèctrica. Considerem que la resistència escalfarà l'aigua des dels 25°C inicials fins a 37°C, que és la temperatura òptima.

$$m \cdot C_e \cdot \Delta T = 400 \text{ kg} \cdot 4,18 \frac{\text{kJ}}{\text{kgK}} \cdot 12 \text{ K} = 20064 \text{ kJ} \quad (19)$$

$$20064 \text{ kJ} \cdot 100 \text{ lots} \cdot \frac{1 \text{ kWh}}{3600 \text{ kJ}} = 557 \text{ kJ} \quad (20)$$

Per tant, el consum elèctric anual com a conseqüència de l'ús del bioreactor és de 14957 kWh.

Amb aquestes dades, i d'acord amb l'Oficina Catalana del Canvi Climàtic [38], la qual descriu que es genera una quantitat de 302 g de CO<sub>2</sub> per cada kWh d'energia

consumida, podem calcular la massa de  $\text{CO}_2$  que es generarà durant un any de treball del bioreactor.

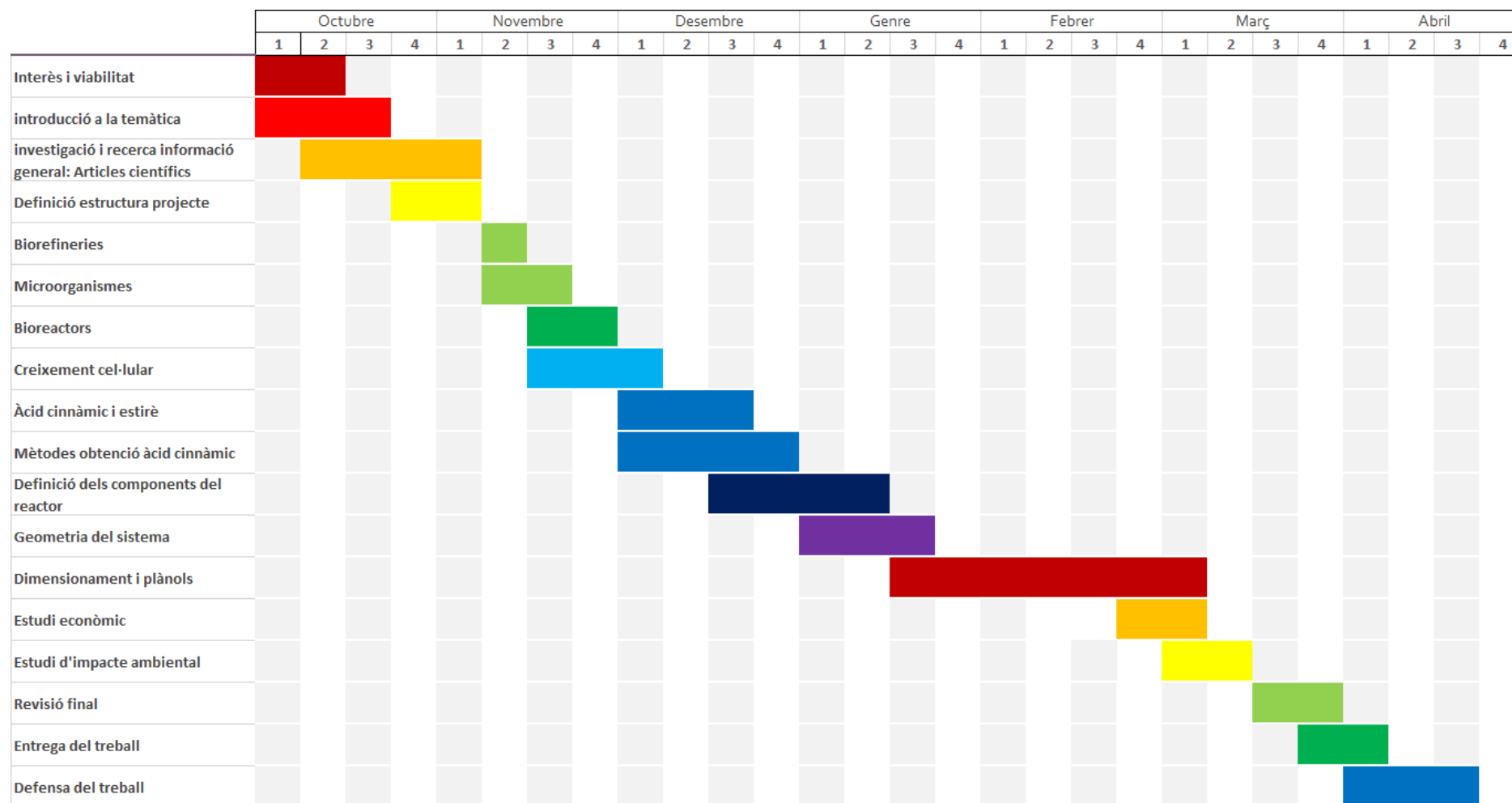
$$14957 \text{ kWh} \cdot 302 \frac{\text{g CO}_2}{\text{kWh}} \cdot \frac{1 \text{ kg CO}_2}{1000 \text{ g CO}_2} = 4517 \text{ kg CO}_2 \quad (21)$$

Coneixent aquesta dada podem calcular quina serà la petjada de  $\text{CO}_2$  per cada kg d'àcid cinnàmic produït:

$$\frac{4517 \text{ kg CO}_2}{250 \text{ kg àcid cinnàmic}} = 18 \frac{\text{kg CO}_2}{\text{kg àcid cinnàmic}} \quad (22)$$

És una generació de  $\text{CO}_2$  molt elevada, principalment degut als petits volums de treball. Si es treballes a escala industrial, molt probablement es reduiria l'emissió de  $\text{CO}_2$  per kg d'àcid cinnàmic produït.

## 15. Planificació del projecte



## 16. Conclusions

L'objectiu principal d'aquest projecte el disseny d'un bioreactor i elaborar els plànols del mateix, amb la finalitat de produir àcid cinnàmic, precursor de l'estirè, i d'aquesta manera donar una alternativa viable a les que s'usen actualment, les quals utilitzen derivats del petroli.

El primer pas ha estat escollir el bacteri a fer servir, mitjançant una recerca bibliogràfica, i s'ha pres com a guia l'estudi fet per *Hyun Bae Bang*, que utilitzava el bacteri *E. Coli* per a poder dur a terme la fermentació.

El tipus de bioreactor escollit ha estat un reactor de tanc agitat discontinu, amb un volum de 400 L, (H=97,5 cm i D=65 cm), i una productivitat de 6g/l de producte. Cada reacció dura 72 hores, aconseguint una producció anual de 250 kg d'àcid cinnàmic.

Els components del bioreactor són un recipient cilíndric d'acer inoxidable AC316, una tapa equipada amb els ports necessaris per a la operació, un sistema d'agitació format per un motor amb una potència de 3000 W, un sistema d'aeració per a una millor transferència d'oxigen i a compta també amb un sistema de control de temperatura i pH.

Pel que fa el motor, la velocitat d'agitació òptima és de 1000 rpm i el sistema d'aeració proporciona 1vvm, equivalent a 400l/min d'aire.

El cost estimat per produir el bioreactor és de 6328,5 euros, i per a dur a terme el projecte, s'estima un cost de 15328,5 euros.





## 17. Bibliografia

### Referències bibliogràfiques

**[1] Asociación Española de Biogás. *Biorefinerías***

<http://www.aebig.org/biorefinerias/> (Consultat : novembre 2018)

**[2] Wikipedia. *Química sostenible***

[https://es.wikipedia.org/wiki/Qu%C3%ADmica\\_sostenible](https://es.wikipedia.org/wiki/Qu%C3%ADmica_sostenible)(Consultat: novembre 2018)

**[3] Universidad de Granada. *Principios de la química sostenible***

[https://www.ugr.es/~fgarciac/qsostenible\\_principios.html](https://www.ugr.es/~fgarciac/qsostenible_principios.html)(Consultat: novembre 2018)

**[4] Wikipedia. *Microorganisme***

<https://en.wikipedia.org/wiki/Microorganism>(Consultat : novembre 2018)

**[5] Wikipedia. *Bacteria***

<https://es.wikipedia.org/wiki/Bacteria> (Consultat : novembre 2018)

**[6] Wikipedia. *Arqueobacteris***

<https://ca.wikipedia.org/wiki/Arqueobacteris> (Consultat: desembre 2018)

**[7] Wikipedia. *Fungi***

<https://es.wikipedia.org/wiki/Fungi>(Consultat: desembre 2018)

**[8] Anna Alboquers Puigdomènech, 2017. Disseny d'un BIOREACTOR per obtenir etilè. (Consultat: novembre 2018)**

**[9] Scribd. *Fermentación microbiana***

<https://www.scribd.com/document/234876345/FERMENTACION-MICROBIANA>(Consultat: desembre 2018)

[10] **Scribd. *Cinética del crecimiento microbiano***

<https://www.scribd.com/doc/267432029/Cinetica-Del-Crecimiento-Microbiano>(Consultat: desembre 2018)

[11] **Wikipedia. *Crecimiento bacteriano***

[https://es.wikipedia.org/wiki/Crecimiento\\_bacteriano](https://es.wikipedia.org/wiki/Crecimiento_bacteriano) (Consultat: desembre 2018)

[12] **SiPAQ (Simulación de Procesos Ambientales y Químicos) en Universitat Politècnica de Valencia. *La ecuación de Monod para simular el comportamiento de bio-reactores***

<http://sipaq.webs.upv.es/la-ecuacion-de-monod-para-simular-el-comportamiento-de-bio-reactores/>(Consultat: desembre 2018)

[13] **Wikipedia. *Organisme aeròbic/anaerobic***

[https://ca.wikipedia.org/wiki/Organisme\\_aer%C3%B2bic](https://ca.wikipedia.org/wiki/Organisme_aer%C3%B2bic)(Consultat: gener 2019)

[14] **Bioingeniería. *Biorreactores y su aplicación***

<https://sites.google.com/site/bioingenieriauv15/unidad-2-biorreactores-y-su-aplicacion>(Consultat: gener 2019)

[15] **Wikipedia. *Reactor químico***

[https://es.wikipedia.org/wiki/Reactor\\_qu%C3%ADmico](https://es.wikipedia.org/wiki/Reactor_qu%C3%ADmico)(Consultat: gener 2019)

[16] **Diversidad Microbiana y taxonomía. *Clases de microorganismos en relación al Ph***

[https://www.diversidadmicrobiana.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=458&Itemid=532](https://www.diversidadmicrobiana.com/index.php?option=com_content&view=article&id=458&Itemid=532)(Consultat: gener 2019)

- [17] **Instituto nacional de tecnologías educativas y formación del profesorado. *Solubilidad del oxígeno en agua***

<http://roble.pntic.mec.es/~mbedmar/iesao/quimica/oxigeno2.htm> (Consultat X)

- [18] **Universidad nacional autónoma de México. *Reactores ideales no isotérmicos***

[http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Balancedeenergia\\_11465.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Balancedeenergia_11465.pdf) (Consultat: gener 2019)

- [19] ***Agitación en reactores***

[https://www.taringa.net/+apuntes\\_y\\_monografias/agitacion-en-reactores\\_139wx1](https://www.taringa.net/+apuntes_y_monografias/agitacion-en-reactores_139wx1) (Consultat: gener 2019)

- [20] ***PubChem U.S National Library of Medicine***

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/styrene> (Consultat: gener 2019)

- [21] **Wikipedia. *Estirè***

<https://ca.wikipedia.org/wiki/Estir%C3%A8> (Consultat: gener 2019)

- [22] **Textos científicos. *Obtención de estireno***

<https://www.textoscientificos.com/polimeros/abs/estireno> (Consultat: gener 2019)

- [23] **Ecu Red. *Estireno***

<https://www.ecured.cu/Estireno> (Consultat: gener 2019)

- [24] **Escuela de ingeniería industrial Universidad de Valladolid. *Productos derivados de los hidrocarburos aromáticos***

<https://www.eii.uva.es/organica/qoi/tema-09.php> (Consultat: febrer 2019)

- [25] **Scribd. *Síntesis de estireno***

<https://www.scribd.com/doc/130248835/SINTESIS-DE-ESTIRENO> (Consultat: febrer 2019)

[26] **Wikipedia. *Cinnamic acid***

[https://en.wikipedia.org/wiki/Cinnamic\\_acid](https://en.wikipedia.org/wiki/Cinnamic_acid)(Consultat: febrer 2019)

[27] Hyun Bae Bang, Kyusgsoo Lee, Yong Jae Lee, Ki Lun Jeong. (2018). High-level production of trans-cinnamic acid by fed-batch cultivation of *E. coli*. Process Biochemistry, 68. (Consultat: novembre 2018)

[28] **Wikipedia. *Compuesto fenólico***

[https://es.wikipedia.org/wiki/Compuesto\\_fen%C3%B3lico](https://es.wikipedia.org/wiki/Compuesto_fen%C3%B3lico) (Consultat: gener 2019)

[29] **Milwaukee. Instrucciones TH310**

<http://www.milwaukeeinst.com/site/manuals/spa/th310.pdf> (Consultat: gener 2019)

[30] **Sensors de pH**

<https://www.yokogawa.com/solutions/products-platforms/process-analyzers/liquid-analyzers/ph-sensors/> (Consultat: gener 2019)

[31] **National Kwikmetals service. *Aceros inoxidables 316 y 316L***

<https://nks.com/es/distribuidor-de-acero-inoxidable/aceros-inoxidables-316/>  
(Consultat: gener 2019)

[32] **Wikipedia. *Casquete esférico***

[https://es.wikipedia.org/wiki/Casquete\\_esf%C3%A9rico](https://es.wikipedia.org/wiki/Casquete_esf%C3%A9rico)(Consultat: gener 2019)

[33] Paulo Rogério Meneses de Sousa. Escalonamento de tanques condicionadores utilizados na flotação de apatita. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010. (Consultat: març 2019)

[34] Eyer, K. Development of an Industrial Biotechnology Process. École Polytechnique Fédérale de Lausanne. (Consultat: gener 2019)

[35] Perry, R. H. (1997). Perry's Chemical Engineers' Handbook Seventh Edition. McGraw-Hill. Pàgines 6.34-6.35. (Consultat: febrer 2019)

[36] **LENNTECH Water Treatment Solutions. MECANISMOS DE TRANSFERENCIA DE OXIGENO.**

<http://www.lennotech.es/biblioteca/index.htm> (Consultat: febrer 2019)

[37] **Vàlvules de bola.**

<https://www.termometros.com/es/Valvula-de-bola-PN-60?gclid=CNtLpsXYoNECFYSfGwod3yUOsA> (Consultat: gener 2019)

[38] **Centro de vigilancia sanitaria. Grupos de riesgo**

<https://www.visavet.es/es/bioslab/grupos-de-riesgo.php> (Consultat: febrer 2019)